

PATENT COOPERATION TREATY

PCTNOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 11 January 2001 (11.01.01)	
International application No.: PCT/JP00/04414	Applicant's or agent's file reference: PH-945-PCT
International filing date: 03 July 2000 (03.07.00)	Priority date: 02 July 1999 (02.07.99)
Applicant: OGATA, Etsuro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

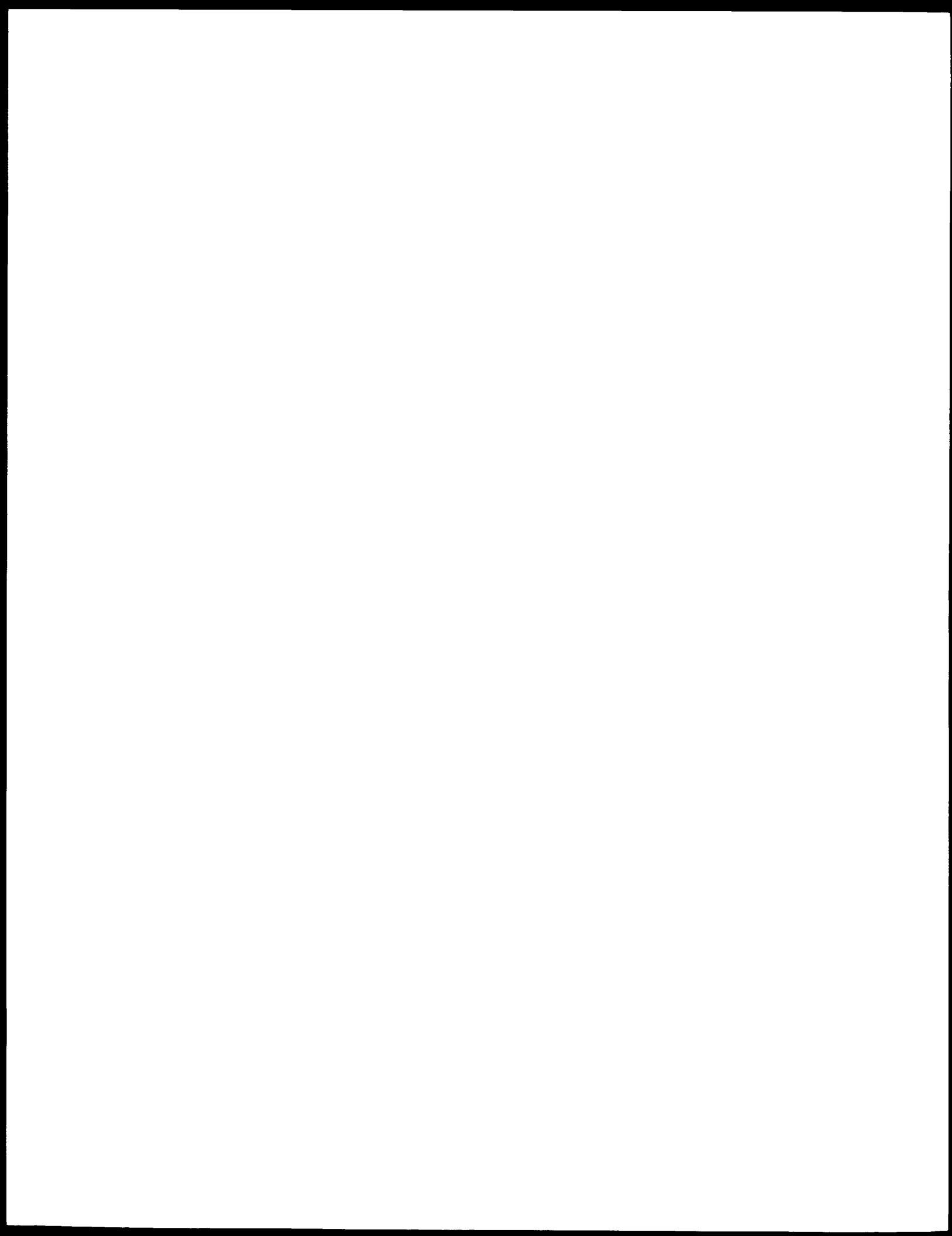
03 July 2000 (03.07.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was
 was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-945-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA 416)	
International application No. PCT/JP00/04414	International filing date (day month year) 03 July 2000 (03.07.00)	Priority date (day month year) 02 July 1999 (02.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45 00, 39 395, A61P 31 14, 29 00, 37 02		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 12 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 July 2000 (03.07.00)	Date of completion of this report 19 January 2001 (19.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT JP00 04414

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application*:

- the international application as originally filed
 the description.

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

- the claims:

pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

- the drawings:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

- the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

4. The amendments have resulted in the cancellation of

- the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets fig. _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)) **

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** An replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT JP00/04414

IV. Lack of unity of invention

1 In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest
- neither restricted nor paid additional fees.

2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report

- all parts
- the parts relating to claims Nos _____



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternal application No
PCT/JP 00/04414**Supplemental Box**
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of IV. 3

The invention described in Claim 1 relates to therapeutic agents for disorders caused by PTH or PTHrP, which contain as an active ingredient an agonist or antagonist which binds to the PTH receptor or PTHrP receptor, or a substance which binds to a ligand for these receptors and promotes or inhibits binding between the receptor and the respective ligand. However, as disclosed, for example, in the documents cited in the description by the present applicant (such as JP, 6-506598, A, JP, 4-228089, A and JP, 5-509098, A), therapeutic agents for said disorders using said ingredients are widely known. Therefore, the "special technical feature" in the invention in the present application is understood to be specific disorders caused by PTH or PTHrP.

Thus, the inventions indicated in 1)-5) below can be identified in Claims 1-17 of the present invention, and there is no technical relationship among these inventions which includes a "special technical feature". Therefore the present application does not fulfil the condition of unity of the invention.

- 1) Claims 1, 2 and 6, and Claims 14-17 in as far as they refer back to Claim 1, 2 or 6
- 2) Claim 3, and Claims 14-17 in as far as they refer back to Claim 3
- 3) Claims 4 and 5, and Claims 14-17 in as far as they refer back to Claim 4 or 5
- 4) Claims 7, 8 and 12, and Claims 14-17 in as far as they refer back to Claim 7, 8 or 12
- 5) Claims 9-11 and 13, and Claims 14-17 in as far as they refer back to any of Claims 9-11 or 13.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/JP 98/04414V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

1	Statement			
Novelty (N)	Claims	6-8, 12, 14	YES	
	Claims	1-5, 9-11, 13, 15-17	NO	
Inventive step (IS)	Claims		YES	
	Claims	1-17	NO	
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES	
	Claims		NO	

2 Citations and explanations

- Document 1: WO, 92/00753, A1
 Document 2: US, 5849695, A
 Document 3: WO, 98/13388, A1
 Document 4: JP, 11-80025, A
 Document 5: WO, 96/03437, A1
 Document 6: EP, 293158, A2
 Document 7: JP, 7-316195, A
 Document 8: WO, 96/39184, A1
 Document 9: JP, 2-207099, A
 Document 10: JP, 4-228089, A
 Document 11: JP, 7-165790, A
 Document 12: WO, 92/17602, A1
 Document 13: WO, 96/33735, A1
 Document 14: EP, 878201, A1
 Document 15: J. G. Hardman et al. (ed), "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics - 9th ed.", McGraw-Hill Companies (USA), pp. 1528-1529
 Document 16: Shigeto Morimoto et al., Clinical Calcium, 5 (12), pp. 50-54 (1995)
 Document 17: S. Yamamoto et al., Endocrinology, 138 (5), pp. 2066-2072 (1997).

Claims 1-5, 9-11, 13 and 15-17



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No
PCT/JP 00/04414

Document 1, claims and description, page 1, lines 10-22, and Document 2, claims and summary, disclose methods for treating cancer, osteoporosis, hypercalcaemia or hyperparathyroidism using polypeptides which act as agonists or antagonists for parathyroid hormone (PTH) or parathyroid hormone-related peptide (PThrP).

Document 3, claims and examples, discloses agents for controlling hypercalcaemia or improving hypophosphataemia using an antibody to PThrP, and indicates that the antibody can be a humanized antibody, and that the hypercalcaemia can be the result of a tumour.

Document 4, claims, discloses an agent containing a substance which inhibits binding of PThrP to its receptor as an active ingredient for treating cachexia, and indicates that said ingredient can be an antagonist or antibody against the PThrP and that such an antibody can be a humanized antibody.

Document 5, claims and page 15, line 15 to page 17, line 26, discloses a method for treating hypercalcaemia or hyperparathyroidism, a method for managing the propagation of tumours promoted by PThrP, a method for treating skin disorders and a method for promoting hair growth, in which the active ingredient is PTH or a PThrP compound which has antagonist activity for PTH/PThrP receptors.

Document 6, claims and description, page 3, line 25 to page 4, line 19, discloses methods for treating hypercalcaemia, hyperparathyroidism, osteoporosis, immune disorders, renal insufficiency and hypertension with a parathyroid hormone antagonist as an active ingredient, and indicates the possibility of using said ingredient for treating disorders caused by abnormal production of hormone-like substances by tumour growth.

Document 7, claims, discloses a calcium metabolism regulator, therapeutic agent for hypercalcaemia, therapeutic agent for osteoporosis, therapeutic agent for



hyperparathyroidism, therapeutic agent for chronic renal sufficiency accompanying high blood PTH and bone lesions accompanying high blood PTHrP, in which the active ingredient is an antagonist of polypeptides having PTH or PTHrP activity.

Document 8, claims, discloses a method for alleviating the toxic effects of an endotoxin or cytokine, in which the active ingredient is a PTHrP antagonist, and suggests an anti-PTHrP antibody as an antagonist and septicaemia as a toxic effect.

Document 9, claims and page 1, lower right column to page 2, lower right column, line 7, discloses a method for treating hypercalcaemia, in which the active ingredient is a PTHrP antagonist, and indicates tumours as a cause of hypercalcaemia.

Document 10, claims and paragraphs [0002], [0003] and [0010], discloses agents in which the active ingredient is an anti-PTHrP monoclonal antibody, for treating or preventing hypercalcaemia, and indicates hyperparathyroidism due to a malignant tumour or excess production of PTH as a cause of hypercalcaemia.

Document 11, claims and paragraphs [0001], [0002], [0005] and [0008] discloses a therapeutic agent for calcium metabolism in which the active ingredient is a polypeptide which does not have human PTHrP activity but blocks the physiological activity of human PTHrP or polypeptides which have human PTHrP activity, and it indicates that the conditions which can be treated include hypercalcaemia, and that the presence of cancer is known to be a cause of hypercalcaemia.

Document 12, claims, description, page 40, line 14 to page 49, line 6 discloses the PTH receptor, the fact that fragments thereof or antibodies to said receptor have an inhibiting effect on activation of the PTH receptor by PTHrP, and agents for treating hypercalcaemia by using



this effect.

Document 13, claims, description page 16, line 23 to page 17, line 27, and Example 7, discloses pharmaceutical compositions in which the active ingredient is an anti-PTHrP antibody, and indicates that the anti-PTHrP antibody can be a humanized antibody and that the compositions are useful for treating bone disorders and metastatic carcinomas.

Document 14, claims, discloses agents containing one or two or more of PTH and PTH derivatives as an active ingredient for preventing and treating thrombocytopaenia.

Therefore, the inventions described in Claims 1-5, 9-11, 13 and 15-17 are not novel because they are described in Documents 1 to 14.

Claim 6

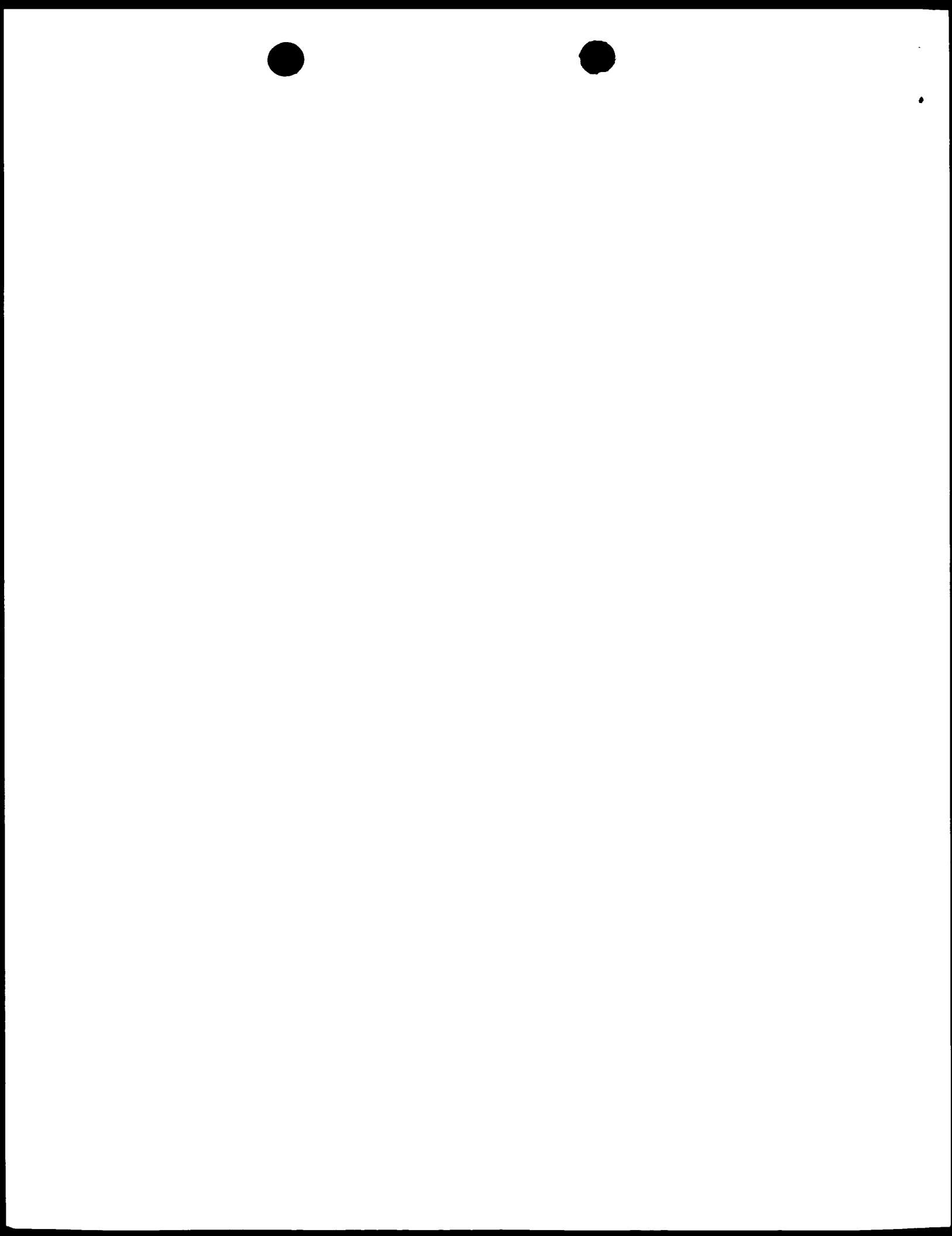
The invention as described in Claim 6 in the present application differs from those in Documents 1, 2, 5-7, 10 and 12 in that it mentions secondary and primary hyperparathyroidism.

However, it is well known that secondary and primary forms of hyperparathyroidism associated with PTH exist, as indicated for example in Document 15; therefore, use of a constituent which is useful for treating hyperparathyroidism and conditions produced as sequelae to said condition for treatment of primary hyperparathyroidism and secondary hyperparathyroidism is within the ordinary capacity for experimentation of a person skilled in the art.

Therefore, the invention as described in Claim 6 does not involve an inventive step.

Claims 7, 8 and 12

The inventions described in Claims 7, 8 and 12



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No
PCT/JP 00/04414

differ from those in Documents 1-14 in that they mention the treatment of central nervous disorders.

However, it is known that PTH is present within and acts upon the central nervous system, as indicated in Document 16 for example, and the fact that central nervous administration of PTH triggers learning and memory disturbance, formation of gastric ulcers and hypersensitivity to pain is known, as indicated in Document 16, page 51, right column to page 52, left column. Therefore, use of an inhibitor of PTH disclosed in Document 1 to 14 for treating central nervous disorders would not require creative skill of a person skilled in the art.

Therefore, the inventions described in 7, 8 and 12 do not involve an inventive step.

Claim 14

The invention described in Document 14 differs from those disclosed in Documents 1-14 in that the PTH/PTHrP receptor type is limited especially to Type I.

However, it is known that there are Type I and Type II PTH/PTHrP receptors, and that Type I receptors are associated with the development of hyperparathyroidism and hypercalcaemia as the result of malignant tumours, as indicated for example in Document 17. Therefore, it would not require special inventive skill of a person skilled in the art to use as the active ingredient of a medicament an agonist or antagonist especially for the Type I PTH/PTHrP receptor.

Therefore, the invention described in Claim 14 does not involve an inventive step.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/JP00/04414

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day month year)	Filing date (day month year)	Priority date (valid claim) (day month year)
WO.00 00219.A1	06 January 2000 (06.01.2000)	25 June 1999 (25.06.1999)	26 June 1998 (26.06.1998)
[EX.EY]			
JP.2000-80100.A	21 March 2000 (21.03.2000)	12 October 1998 (12.10.1998)	17 June 1998 (17.06.1998)
[EX.EY]			26 June 1998 (26.06.1998)
WO.99 57139.A2[EX]	11 November 1999 (11.11.1999)	03 May 1999 (03.05.1999)	05 May 1998 (05.05.1998)
JP.11-222440.A	17 August 1999 (17.08.1999)	03 February 1998 (03.02.1998)	
[EX.EY]			

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day month year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day month year)

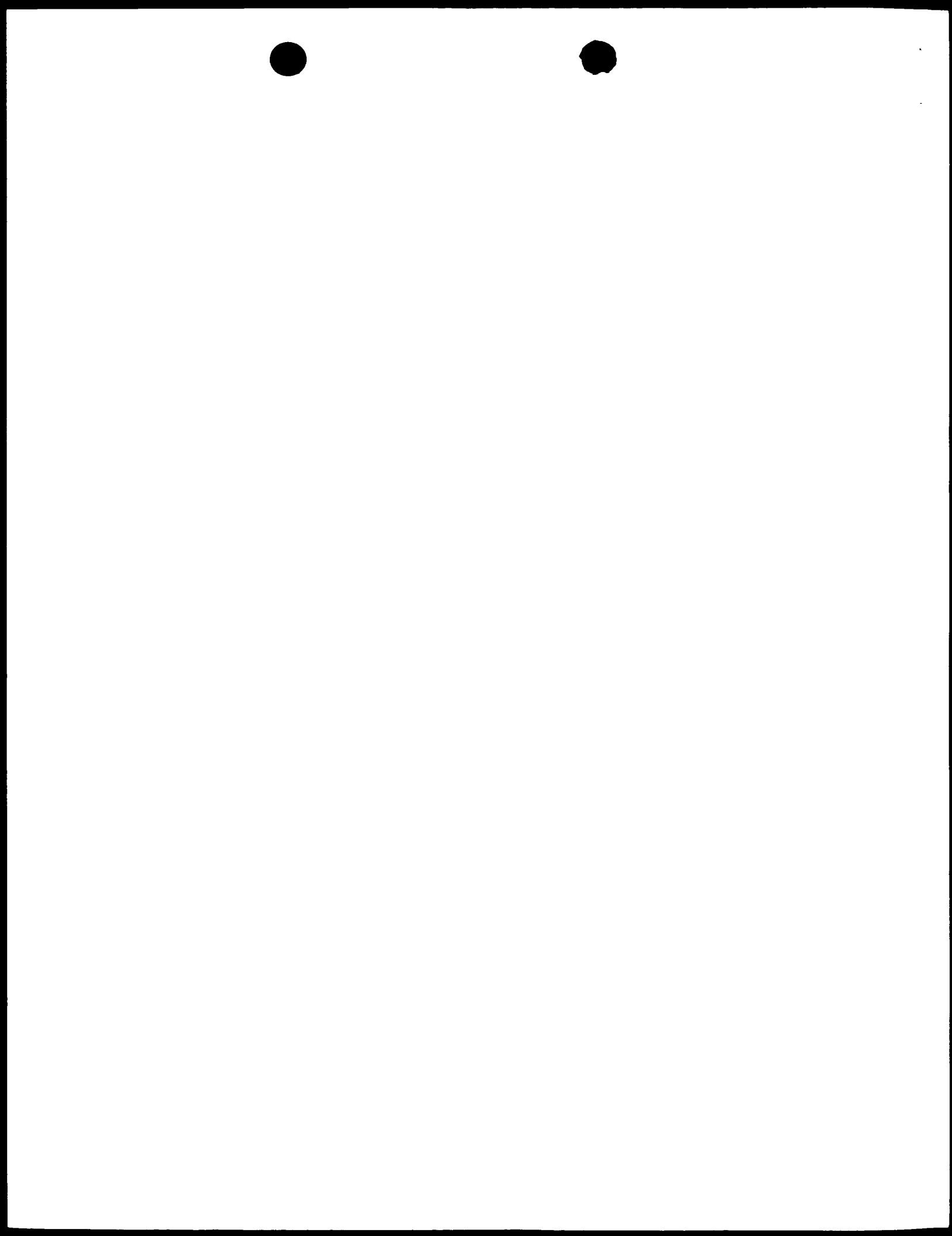


INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No
PCT/JP 93/04414**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Claim 14 refers to "the PTH/PTHrP Type I receptor", and this is explained specifically in the description, page 6, lines 3-5.

However, JP, 6-506598, A, cited in the relevant portion of the description, nowhere mentions said receptor.



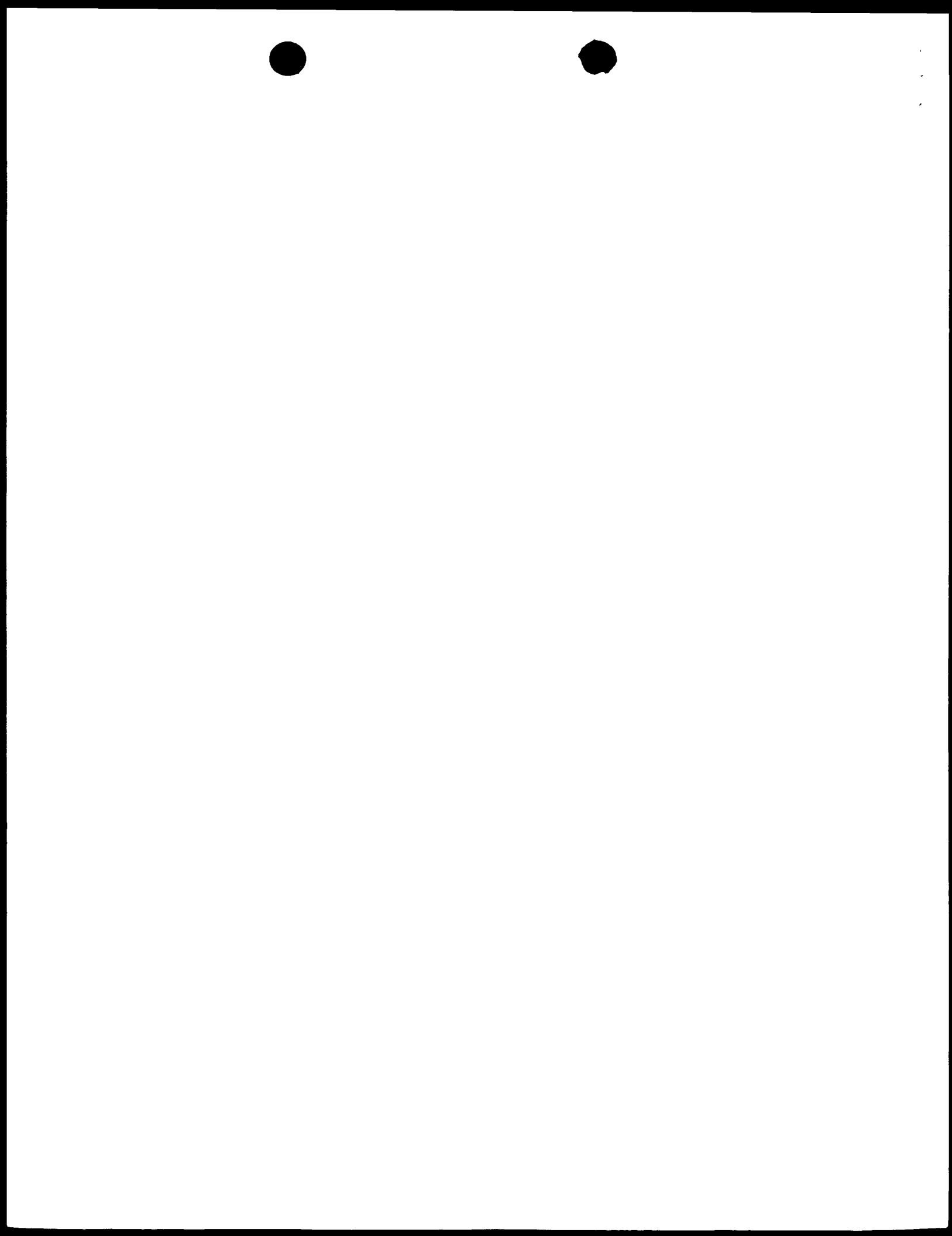
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No
PCT/JP 00/04414**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-5, 9-11, 13 and 14

These claims are delimited by the statement that the active ingredient of the remedy is "an agonist or antagonist" or "a substance which binds to a ligand for these receptors and promotes or inhibits binding between the receptor and the respective ligand".

However, the disorders mentioned in the same claims embrace widely known disorders, and hence they also embrace a large number of remedies for these disorders. Consequently, the technical feature of the invention described in these claims is not clear from the aforementioned statement, and as a result it is impossible to identify a single overall concept in the invention described in these claims.



特許審査条約

PCT

REC'D 09 FEB 2001

国際予備審査報告

PCT

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT第36条及びPCT規則70)出願人又は代理人
の書類記号 PH-945-PCT 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT
IPEA-416）を参照すること。国際出願番号
PCT J P 00 / 04414 国際出願日
(日、月、年) 03. 07. 00 優先日
(日、月、年) 02. 07. 99

国際特許分類 (IPC) Int.C11A 61K 45 00, 39, 395, A 61P 3/14, 29 00, 37 02

出願人（氏名又は名称）
中外製薬株式会社

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT第36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 9 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第60.7号参照)

この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の單一性の欠如
- V PCT第35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日
03. 07. 00国際予備審査報告を作成した日
19. 01. 01

名称及びあて先

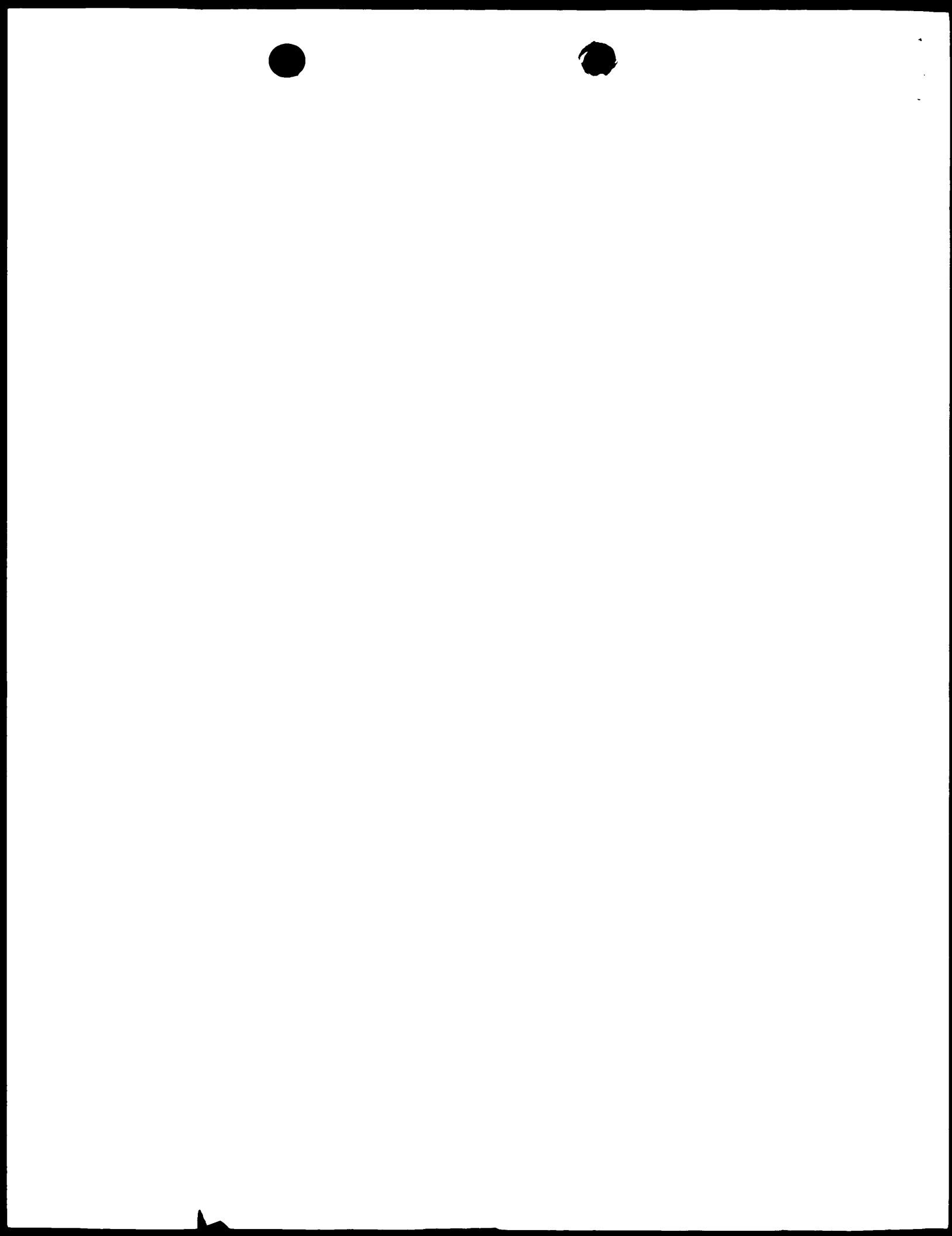
日本国特許庁 IPEA JP
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許官審査官（権限のある職員）

4C 9736

今村玲英子郎

電話番号 03-3581-1101 内線 3450



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条・PCT 1-4条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。(PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/>	明細書 第	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	PCT 1-9条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第	ページ／図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第	ページ／図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第	ページ／図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(c)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

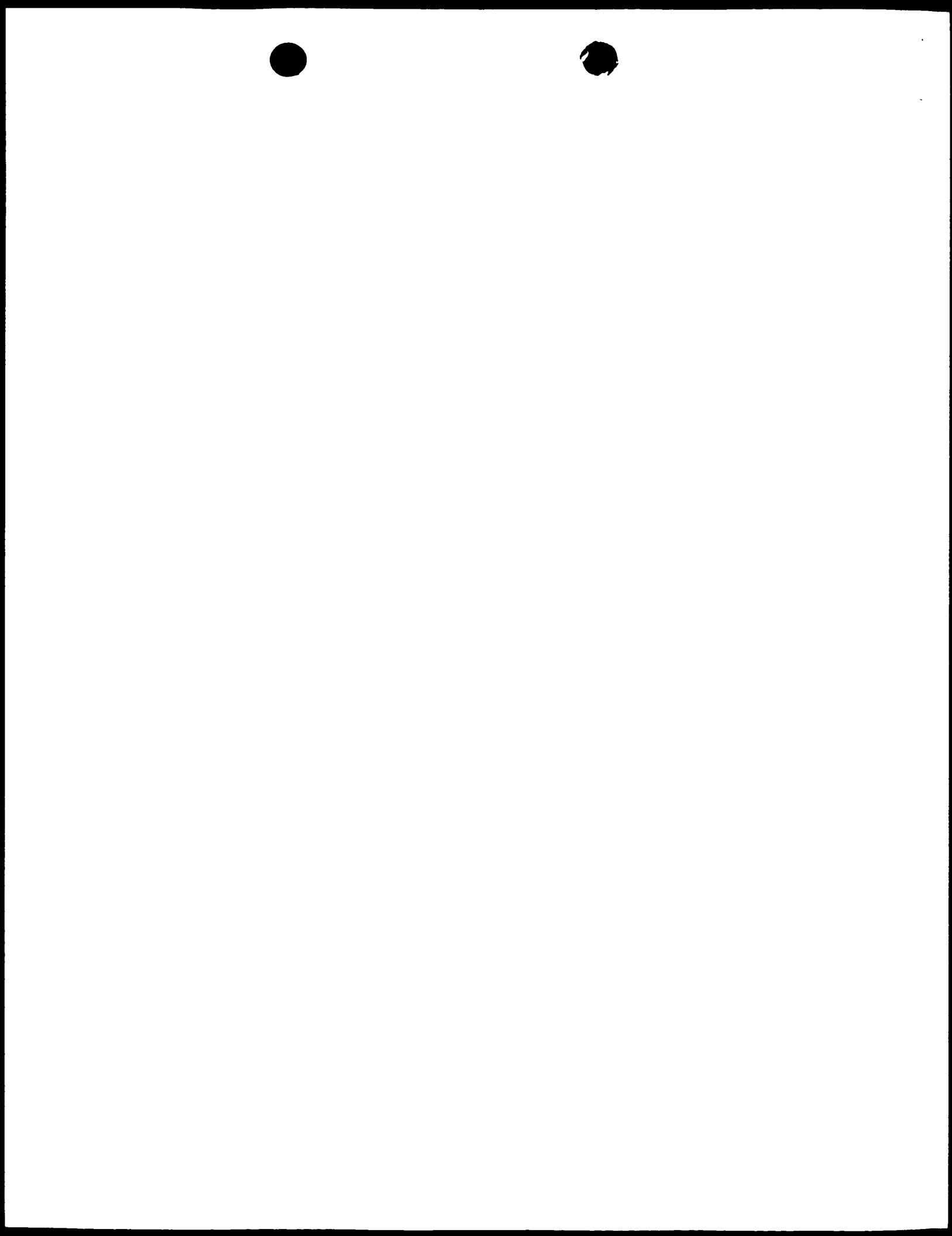
3. この国際出願は、タケンオチドヌアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 文面の第 _____ ページ／図

5. この国際予備審査報告は、補正欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c)) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



IV. 発明の單一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、
- 請求の範囲を減縮した。
- 追加手数料を納付した。
- 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかつた。
2. 国際予備審査機関は、次の理由により発明の單一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の單一性を次のように判断する。

- 満足する
- 以下の理由により満足しない。

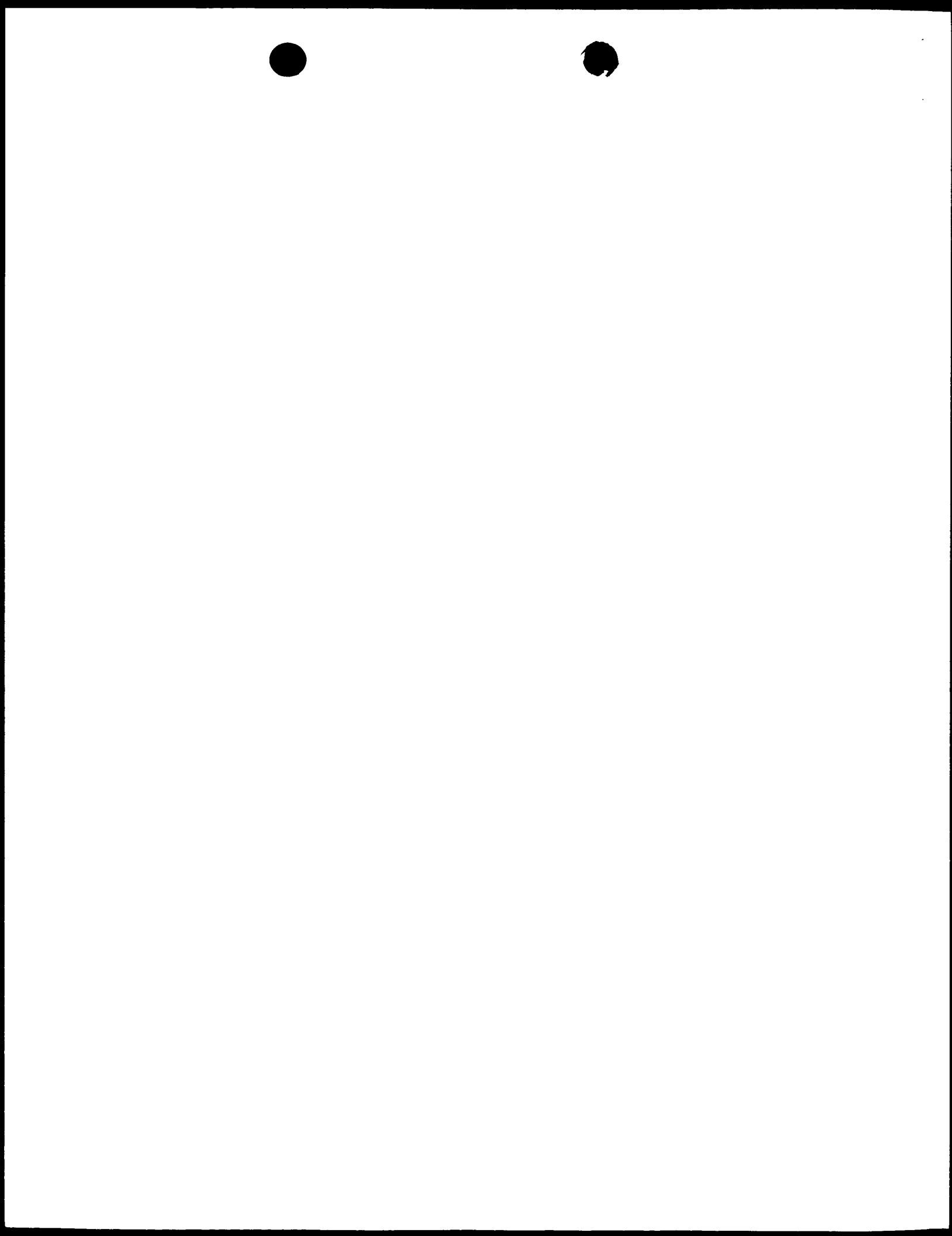
請求の範囲1に係る発明は、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHRPに起因する疾患の治療剤に関するものであるが、出願人が明細書に引用している文献 (JP, 6-506598, A、JP, 4-228089, A、JP, 5-509098, Aなど) にもあるように、かかる成分を利用した、かかる疾患の治療剤は広く知られているものであるから、本願発明における「特別な技術的特徴」はPTHまたはPTHRPに起因する具体的な疾患にあるものと認められる。

そして本願の請求の範囲1～17は以下の1)～5)に示す発明を有するものと認められるが、これらの発明の間に「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係があるものとは認められず、本願は発明の單一性の要件を満たしていない。

- 1) 請求の範囲1、2及び6並びに請求の範囲14～17のうち、請求の範囲1、2及び6を引用する部分
- 2) 請求の範囲3及び請求の範囲14～17のうち、請求の範囲3を引用する部分
- 3) 請求の範囲4及び5並びに請求の範囲14～17のうち、請求の範囲4及び5を引用する部分
- 4) 請求の範囲7、8及び12並びに請求の範囲14～17のうち、請求の範囲7、8及び12を引用する部分
- 5) 請求の範囲9～11及び13並びに請求の範囲14～17のうち、請求の範囲9～11及び13を引用する部分

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- すべての部分
- 請求の範囲 _____ に関する部分



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第1-2条・PCT3-5条(2)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 6-8, 12, 14 1-5, 9-11, 13, 15-17	有 無
---------	--	--------

進歩性 (I S)	請求の範囲 1-17	有 無
-----------	---------------	--------

産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1-17	有 無
-----------------	---------------	--------

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: WO, 92 00753, A1
 文献2: U.S., 5849695, A
 文献3: WO, 98 13388, A1
 文献4: J.P., 11-80025, A
 文献5: WO, 96 03437, A1
 文献6: E.P., 293158, A2
 文献7: J.P., 7-316195, A
 文献8: WO, 96 39184, A1
 文献9: J.P., 2-207099, A
 文献10: J.P., 4-228089, A
 文献11: J.P., 7-165790, A
 文献12: WO, 92 17602, A1
 文献13: WO, 96 33735, A1
 文献14: E.P., 878201, A1

文献15: HARDMAN, J. G., et al. (ed.), "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS - 9th ed", McGraw-Hill Companies (U.S.A.), pp. 1528-1529

文献16: 森本茂人ら, CLINICAL CALCIUM, 5(12), pp. 50-54 (1995)

文献17: YAMAMOTO, S., et al., Endocrinology, 138(5), pp. 2066-2072 (1997)

○請求の範囲 1-5, 9-11, 13, 15-17について

文献1の特許請求の範囲及び明細書の第1頁10-22行、及び文献2の特許請求の範囲及び要約には、副甲状腺ホルモン（以下PTHという。）または副甲状腺ホルモン関連ペプチド（以下PTHRPという。）に対してアゴニスト特性またはアンタゴニスト特性を有するポリペプチドを用いた、ガン、骨粗鬆症、高カルシウム血症または副甲状腺機能亢進症の治療方法が記載されている。

文献3の特許請求の範囲及び実施例には、PTHRPに対する抗体を用いた高カルシウム血症抑制剤又は低リン血症改善剤が記載されており、抗体にはヒト型化抗体が含まれ、高カルシウム血症には腫瘍に伴うものが含まれることが記載されている。

文献4の特許請求の範囲には、PTHRPとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する悪液質治療剤が記載されており、該成分はPTHRP受容体に対するアンタゴニストまたは抗体であり、該抗体はヒト型化されたものを包含することが記載されている。

(以降、第V欄の続き・その1へ)



VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (P C T 規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日, 月, 年)	出願日 (日, 月, 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日, 月, 年)
WO, 00/00219, A1 「E X, E Y」	06. 01. 00	25. 06. 99	26. 06. 98
JP, 2000-80100, A 「E X, E Y」	21. 03. 00	12. 10. 98	17. 06. 98 26. 06. 98
WO, 99/57139, A2 「E X」	11. 11. 99	03. 05. 99	05. 05. 98
JP, 11-222440, A 「E X, E Y」	17. 08. 99	03. 02. 98	

2. 書面による開示以外の開示 (P C T 規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日, 月, 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日, 月, 年)



VII. 国際出願の不備

この国際出願の形式又は内容について、次の不備を発見した。

○請求の範囲 1-4 には「PTH/PThrPタイプ I 受容体」について記載されており、その具体的な説明が明細書第 6 頁 3-5 行に記載されている。
しかしながら、明細書の当該部分で引用されている特表平6-506598号 (JP, 6-50659
8, A) にはかかる受容体について言及されている部分が存在しない。



VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付けについての意見を次に示す。

○請求の範囲 1 - 5、9 - 11、13、14について

同項では、薬剤の有効成分を「アゴニスト又はアンタゴニスト、または「これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質」なる記載によって限定しているものである。

しかしながら、同項に記載されている疾患には広く知られた疾患が含まれ、それに対する治療剤も多数含まれているため、かかる記載によっては同項に係る発明の技術的特徴が不明確なものであり、結果として同項に係る発明をまとまりのある一の概念としてとらえることができないものとなっている。



補充欄 (いざれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 VI 欄の続き

(第 VI 欄の続き・その 1)

文献 5 の特許請求の範囲及び第 15 頁 15 行 - 第 17 頁 26 行には、PTH・PTHRP 受容体に対しアンタゴニスト活性を有する PTH または PTHRP 化合物を有効成分とする、高カルシウム血症や副甲状腺機能亢進症の治療方法、PTHRP により促進される腫瘍増殖に対する処置方法、皮膚疾患の治療方法及び毛髪生育促進方法が記載されている。

文献 6 の特許請求の範囲及び明細書第 3 頁 25 行 - 第 4 頁 19 行には、副甲状腺ホルモン拮抗剤を有効成分とする、高カルシウム血症、副甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症、免疫疾患、腎不全及び高血圧の治疗方法が記載されており、該成分は腫瘍増殖によるホルモン様物質の異常産生に起因する疾患の治療に利用可能であると記載されている。

文献 7 の特許請求の範囲には、PTH または PTHRP 活性を有するポリペプチドに対する拮抗剤を有効成分とする、カルシウム代謝調節剤、高カルシウム血症治療剤、骨粗鬆症治療剤、副甲状腺機能亢進症治療剤、高 PTH 血症に伴う慢性腎不全治療剤及び高 PTHRP 血症に伴う骨病変治療剤が記載されている。

文献 8 の特許請求の範囲には、PTHRP に対するアンタゴニストを有効成分とする、エンドトキシンまたはサイトカインによる毒性効果の軽減方法が記載されており、アンタゴニストとして PTHRP に対する抗体が、また毒性効果として敗血症が記載されている。

文献 9 の特許請求の範囲及び第 1 頁右下欄 - 第 2 頁右下欄 7 行には、PTHRP に対するアンタゴニストを有効成分とする高カルシウム血症の治疗方法が記載されており、高カルシウム血症の原因として腫瘍が記載されている。

文献 10 の特許請求の範囲並びに【0002】、【0003】及び【0010】の各段落には、PTHRP に対するモノクローナル抗体を用いた高カルシウム血症治療・予防剤が記載され、高カルシウム血症の原因として悪性腫瘍や PTH の過剰産生による副甲状腺機能亢進症が記載されている。

文献 11 の特許請求の範囲並びに【0001】、【0002】、【0005】及び【0008】の各段落には、ヒト PTHRP 活性を有さず、ヒト PTHRP 又はヒト PTHRP 活性を有するポリペプチドの生理学的作用に拮抗する活性を有するポリペプチドを有効成分とするカルシウム代謝治療剤が記載されており、治療対象には高カルシウム血症が含まれ、高カルシウム血症の原因として癌の存在が知られていることが記載されている。

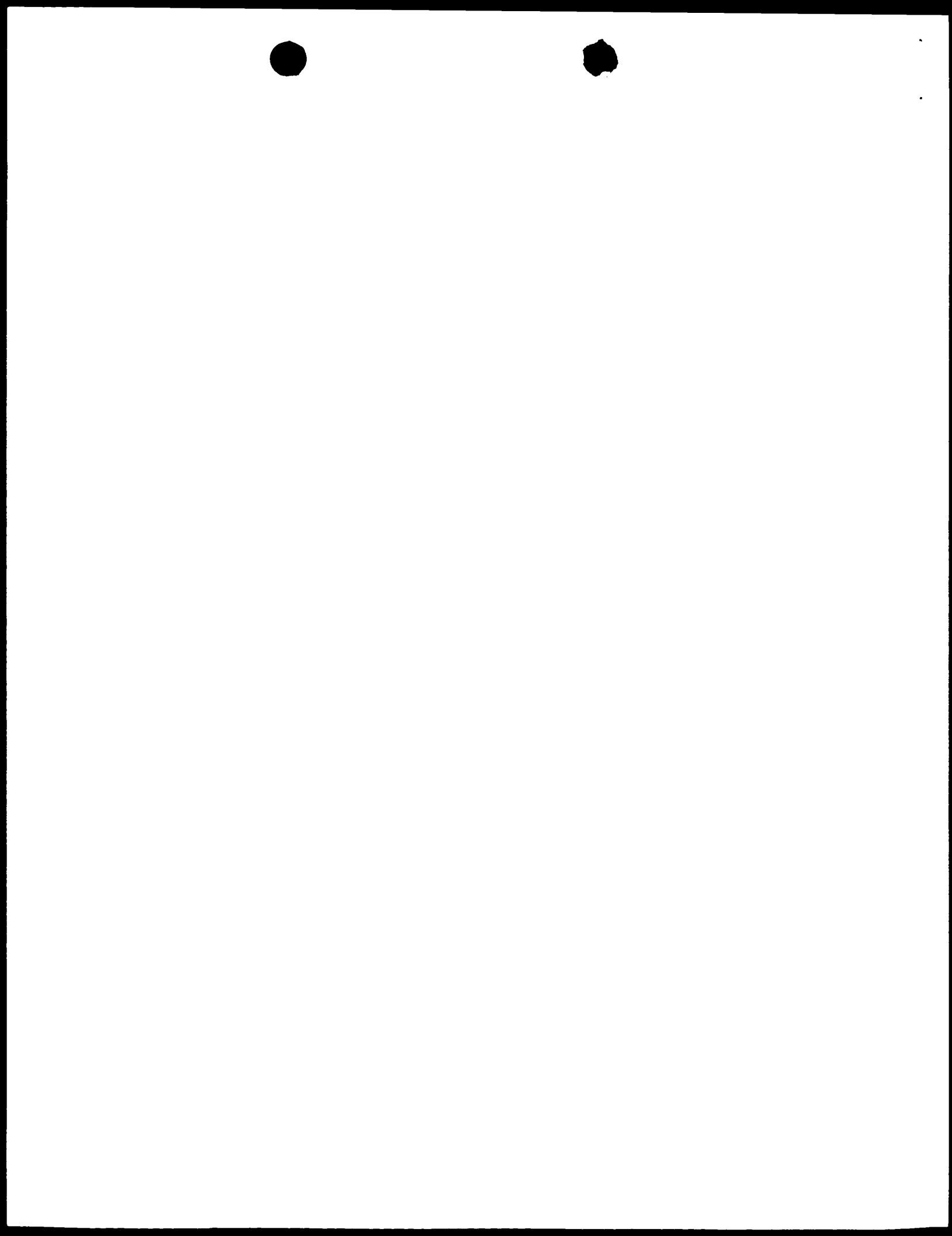
文献 12 の特許請求の範囲及び明細書第 40 頁 14 行 - 第 49 頁 6 行には、PTH 受容体、その断片又は該受容体に対する抗体が PTHRP による PTH 受容体の活性化を阻害する作用を有すること、及びかかる作用を用いた高カルシウム血症治療剤が記載されている。

文献 13 の特許請求の範囲、明細書第 16 頁 23 行 - 第 17 頁 27 行及び実施例 7 には、PTHRP に対する抗体を有効成分とした医薬組成物が記載されており、PTHRP に対する抗体はヒト型化されたものを包含し、骨の疾患及び転移性癌の治療に有用であることが記載されている。

文献 14 の特許請求の範囲には、PTH または PTH 誘導体の 1 種または 2 種以上を有効成分として含有する血小板減少症の予防剤および治療剤が記載されている。

してみれば、請求の範囲 1 - 5、9 - 11、13、15 - 17 に係る発明は、文献 1 ないし 14 に記載されているから、新規性を有しない。

(以降、第 VI 欄の続き・その 2 へ)



補充欄：いざれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること。

第 V 欄の続き

(第V欄の続き・その2)

○請求の範囲6について

本願の請求の範囲6に係る発明は、副甲状腺機能亢進症について、二次性のものと原発性のものが別々に記載されている点で文献1、2、5ないし7、10並びに12のものに相違する。

しかしながら、文献15にもあるように、PTHに関する副甲状腺機能亢進症では、原発性のもの及び二次性のものは共によく知られた疾患であるから、副甲状腺機能亢進症及び該疾患に随伴して生じる疾患の治療に有用である有効成分を原発性副甲状腺機能亢進症及び二次性副甲状腺機能亢進症の治療に用いることは、当業者であれば通常実施する程度の事項である。

したがって、請求の範囲6に係る発明は進歩性を有しない。

○請求の範囲7、8、12について

本願の請求の範囲7、8及び12に係る発明は、中枢神経系疾患の治療について言及している点で文献1ないし14のものに相違する。

しかしながら、文献16にもあるように、PTHは中枢神経系に存在し作用することが知られており、また文献16の第51頁右欄—第52頁左欄にあるように、PTHの中枢投与により学習や記憶の障害、胃潰瘍形成、痛覚過敏の惹起の生じることが知られているから、文献1ないし14に記載のPTHの機能を阻害する物質を、中枢系疾患の治療のために用いることは、当業者にとって格別の創意を要したものとは認められない。

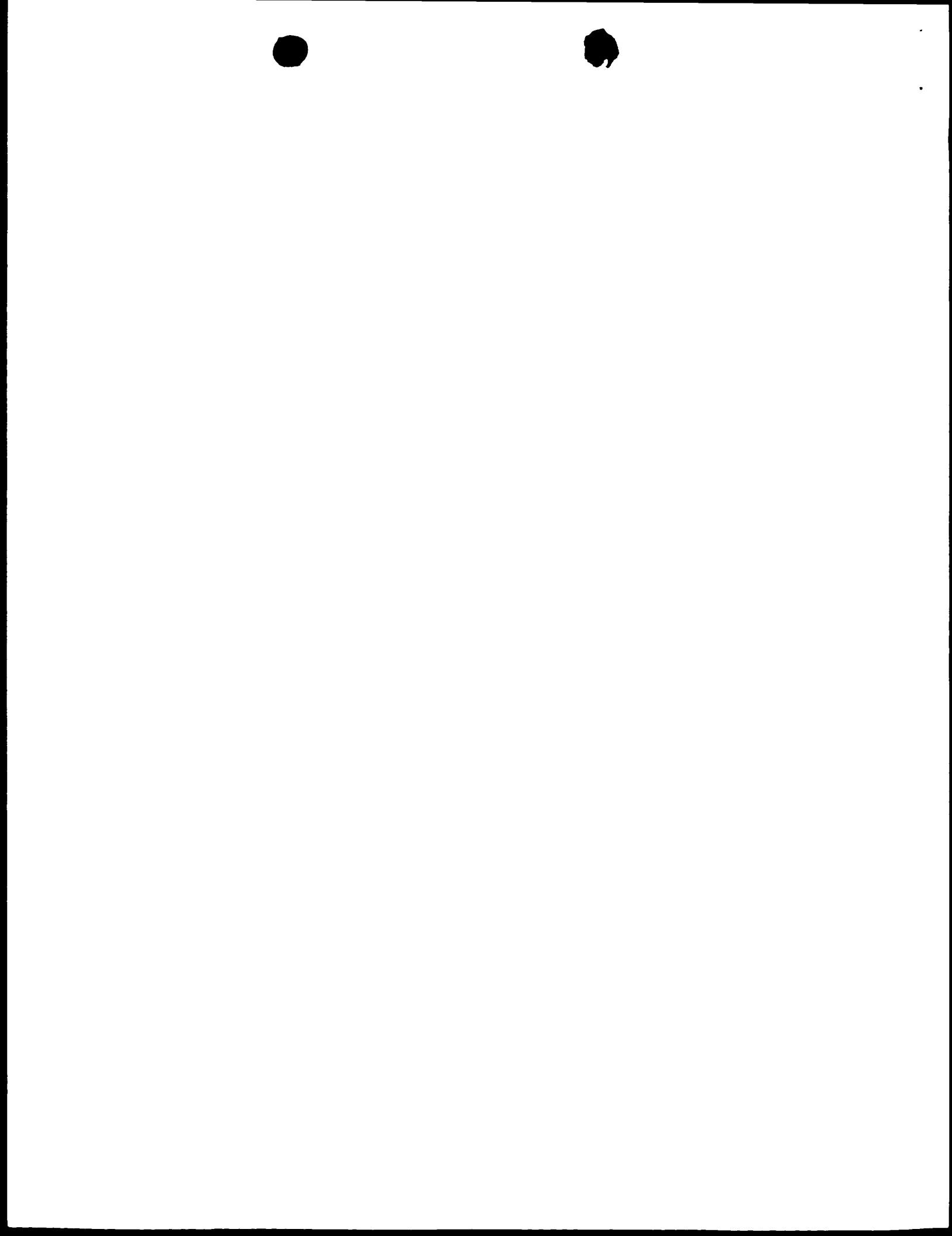
したがって、請求の範囲7、8、12に係る発明は進歩性を有しない。

○請求の範囲14について

本願の請求の範囲14に係る発明は、PTH/PTHRP受容体を特にタイプIのものに限定している点で、文献1ないし14のものに相違する。

しかしながら、文献17にもあるように、PTH/PTHRP受容体にタイプI及びタイプIIのものがあり、タイプIのものが悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症や副甲状腺機能亢進症の発症に関連のあることは公知であるから、PTH/PTHRP受容体のうち、特にタイプIのものに対するアゴニストまたはアンタゴニストを薬剤の有効成分とすることに当業者が格別の創意を要したものとは認められない。

したがって、請求の範囲14に係る発明は進歩性を有しない。



Attachment to Form PCT/ISA/210/Part VI

Observations where unity of invention is lacking

Detailed reasons for holding lack of unity of invention

The claims of the two groups are directed to distinct methods having the characteristics of two distinct inventive concepts. The method of group I pertains to the administration of a pharmaceutical composition to a subject. The method of group II pertains to an in vitro assay method. PCT Rule 13.2 does not provide for distinct methods within the same inventive concept.

Itemized summary of claims groupings

I. Claims 1-29, drawn to pharmaceutical compositions and method of administering the compositions, classified in class 514, subclass 12.

II. Claims 30-35, drawn to methods for selecting useful polypeptide sequences, classified in class 536, subclass 86.



10,0195/1
531 Rec'd PCT/Fr. 31 DEC 2001

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 Representative: Osamu Nagayama
 Address: 5-1, Ukimura 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (MBC1L24)	Accession Number: FERM BP-5627
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
<p>The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> A Scientific Property <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic Position</p>	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. <small>(date of the original deposit)</small></p>	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
<p>This International Depository Authority received the microorganism under I above on <small>(date of the original deposit)</small>, and received on , a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.</p>	
V . INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
<p>Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>Representative: <u>Michio Ohishi</u> (sealed) <small>Ph. D., DIRECTOR GENERAL.</small></p> <p>Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan</p> <p>Date: August 15, 1996</p>	



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 中外製薬株式会社
寄託者 取締役社長 永山 治
あて名 〒 115
東京都北区浮間5丁目5番1号

般

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli JM109 (MBC1L24)

(受託番号)

FERM BP- 5627

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 棚の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日（原寄託日）に受領した1棚の微生物を受託する。

移管請求の受領

本国際寄託当局は、
そして、 年 月 日（原寄託日）に1棚の微生物を受領した。
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 大石 道夫

Mitsuo Ochiai, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashib1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
Representative: Osamu Nagayama
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (MBC1H04)	Accession Number: FERM BP-5628
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).	
<input checked="" type="checkbox"/> A Scientific Property <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depository Authority received the microorganism under I above on _____ (date of the original deposit), and received on _____, a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Representative: <u>Michio Ohishi</u> (sealed) Ph. D., DIRECTOR GENERAL. Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan	
Date: August 15, 1996	



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名（名称） 中外製薬株式会社
寄託者 取締役社長 永山 治
あて名 〒 115
東京都北区浮間5丁目5番1号

殿

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli JM109 (MBC1H04)

(受託番号)
FERM BP- 5628

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8年 8月 15日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫
Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashib1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 8年 (1996) 8月15日



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
Representative: Osamu Nagayama
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19)	Accession Number: FERM BP-5629
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s). <input checked="" type="checkbox"/> A Scientific Property <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on _____ (date of the original deposit), and received on _____, a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Representative: <u>Michio Ohishi</u> (sealed) Ph. D., DIRECTOR GENERAL. Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan Date: August 15, 1996	



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） 中外製薬株式会社
寄託者 取締役社長 永山 岩
あて名 〒 115
東京都北区浮間5丁目5番1号

殿

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

Escherichia coli JM109 (λMBC1HcDNA/pUC19)

(受託番号)

FERM BP- 5629

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 條の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日（原寄託日）に受領した1條の微生物を受託する。

移管請求の受領

本国際寄託当局は、
そして、 年 月 日（原寄託日）に1條の微生物を受領した。
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 大石 達夫

Microbial Division, DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashitochome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日



INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
Representative: Osamu Nagayama
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: Escherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ / pUC19)	Accession Number: FERM BP-5630
II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).	
<input checked="" type="checkbox"/> A Scientific Property <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic Position	
III . RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996. (date of the original deposit)	
IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER	
This International Depositary Authority received the microorganism under I above on _____ (date of the original deposit), and received on _____, a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.	
V . INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Representative: <u>Michio Ohishi</u> (sealed) <u>Ph. D.</u> , DIRECTOR GENERAL. Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan	
Date: August 15, 1996	



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名（名称） 中外製薬株式会社
寄託者 取締役社長 水山 治
あて名 〒 115
東京都北区浮間5丁目5番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した鑑別のための表示)

Escherichia coli JM109 (λMBC1Lq1/pUC19)

(受託番号)
FERM BP- 5630

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

送信請求の受領

本国際寄託当局は、
そして、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

4. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 大石 達夫

Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashimachi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
Representative: Osamu Nagayama
Address: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115

I . IDENTIFICATION OF MICROORGANISM

Identification Reference Given by the Depositor: mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1	Accession Number: FERM BP-5631
--	-----------------------------------

II . A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION

The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s).

- A Scientific Property
- Taxonomic Position

III . RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on August 15, 1996.
(date of the original deposit)

IV . RECEIPT OF REQUEST FOR TRANSFER

This International Depositary Authority received the microorganism under I above on _____ (date of the original deposit), and received on _____, a request for transfer from the original deposit to the deposit under the Budapest treaty.

V . INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

Representative: Michio Ohishi (sealed)
Ph. D., DIRECTOR GENERAL.

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan

Date: August 15, 1996



[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名（名称） 中外製薬株式会社
寄託者 取締役社長 水山 治
あて名 〒 115
東京都北区浮間5丁目5番1号

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1

(受託番号)

FERM BP- 5631

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 8 年 8 月 15 日（原寄託日）に受領した1欄の微生物を受託する。

移管請求の受領

本国際寄託当局は、
そして、 年 月 日（原寄託日）に1欄の微生物を受領した。
年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Natural Science and Technology

所 長 太石 道夫

Michio OTANI, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 8 年 (1996) 8 月 15 日

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US91/04971

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁸

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

IPC(5): A61K 37/30; C07K 3/04, 7/36; C01N 33/15, 33/74, 33/566

U.S. CL.: 530/324; 514/12; 436/86, 501

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
U.S. CL.	514/12; 530/324; 436/86, 501

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

APS, search terms: parathyroid (w) hormone?, agonist?, antagonist?, assay?, bone(w) cell?

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *

Category * ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X, P	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Volume 266, No. 3. issued 25 January 1991, F.E. Cohen et al., "Analogues of Parathyroid Hormone Modified at Positions 3 and 6", pages 1997-2004, see entire document.	1-35
Y	US.A. 4.508,828 (LINDAILET AL) 02 April 1985, see column 5, line 50 to column 6, line 30, and column 1, line 65 to column 2, line 68.	30-35
Y	ACTA ENDOCRINOLOGICA, Volume 100, No. 3, issued July 1982, R. Zonefrati et al.: "Parathyroid hormone bioassay using human kidney cortical cells in primary culture" pages 398-405. see Abstract.	30-35

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

08 OCTOBER 1991

Date of Mailing of this International Search Report

07 NOV 1991

International Searching Authority

ISA/US

Signature of Authorized Officer

STEPHEN WALSH

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y,P	US.A. 4,968,669 (ROSENBLATT et al.) 06 November 1990. see columns 7 and 8.	30-35
A	US.A. 4,771,124 (ROSENBLATT et al.) 13 September 1988.	15-21
Y	US.A. 3,886,132 (BREWER et al.) 27 May 1975. see entire document.	15,21
Y	G. SCHULZ et al., "PRINCIPLES OF PROTEIN STRUCTURE", published 1979 by Springer-Verlag (N.Y.), see pages 14-16.	15,21

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. Claim numbers because they relate to subject matter^{1,2} not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out^{1,2}, specifically:

3. Claim numbers because they are dependent claims not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

See attached

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

E P

U S

P C T

特許協力条約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 PH-945-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/04414	国際出願日 (日、月、年)	03.07.00	優先日 (日、月、年)
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 7 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

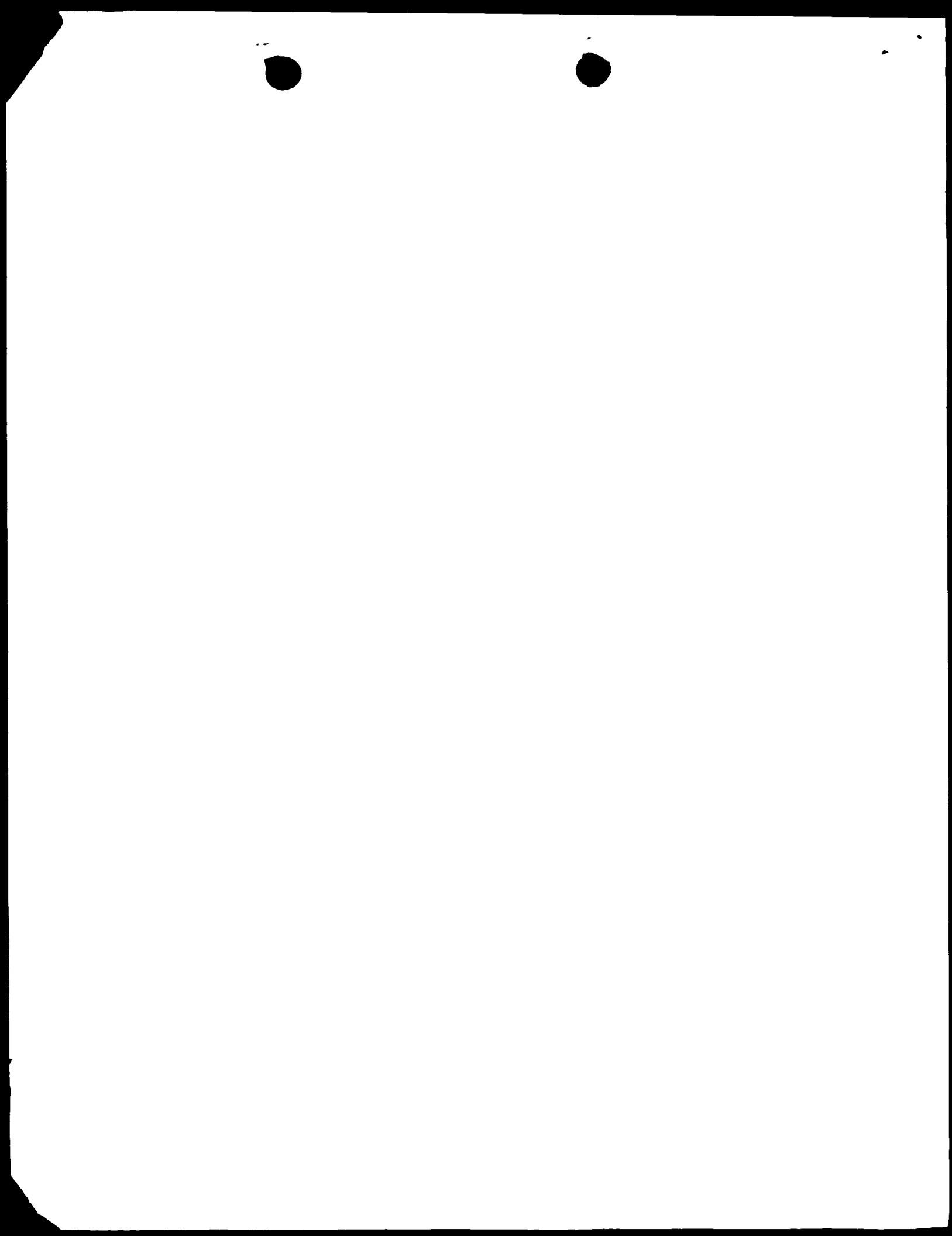
6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(別紙参照のこと)

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。



○第II欄の続き

請求の範囲1に係る発明は、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHRPに起因する疾患の治療剤に関するものであるが、出願人が明細書に引用している文献 (JP, 6-506598, A、JP, 4-228089, A、JP, 5-509098, Aなど) にもあるように、かかる成分を利用した、かかる疾患の治療剤は広く知られているものであるから、本願発明における「特別な技術的特徴」はPTHまたはPTHRPに起因する具体的な疾患にあるものと認められる。

そして本願の請求の範囲1-17は以下の1)~5)に示す発明を有するものと認められるが、これらの発明の間に「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係があるものとは認められず、本願は発明の單一性の要件を満たしていない。

- 1) 請求の範囲1, 2及び6並びに請求の範囲14-17のうち、請求の範囲1, 2及び6を引用する部分
- 2) 請求の範囲3及び請求の範囲14-17のうち、請求の範囲3を引用する部分
- 3) 請求の範囲4及び5並びに請求の範囲14-17のうち、請求の範囲4及び5を引用する部分
- 4) 請求の範囲7, 8及び12並びに請求の範囲14-17のうち、請求の範囲7, 8及び12を引用する部分
- 5) 請求の範囲9-11及び13並びに請求の範囲14-17のうち、請求の範囲9-11及び13を引用する部分



A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' A 61 K 45/00, 39/395, A 61 P 3/14, 29/00, 37/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl' A 61 K 38/00-38/32, 45/00-45/08, 39/395,
A 61 P 3/14, 29/00, 37/00-37/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 92/00753, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23. 1月. 1992 (23. 01. 92), 特許請求の範囲, 第1頁第10-22行,	1-5, 9-11, 13, 15, 16
Y	& JP, 5-509098, A, 特許請求の範囲, 第5頁右下欄—第6頁左上欄, & AU, 9182900, A, & EP, 539491, A1	6-8, 12, 14
X	U.S., 5849695, A (The Regents of the University of California), 15. 12. 1998 (15. 12. 98), 特許請求の範囲, 要約 (ファミリーなし)	1-5, 9-11, 13
Y		6-8, 12, 14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06.09.00	国際調査報告の発送日 19.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 4C 9736 今村 玲英子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO, 98/13388, A1 (中外製薬株式会社), 2. 4月. 1998 (02. 04. 98), 特許請求の範囲, 実施例,	1-5, 9-11, 13, 15-17
Y	& JP, 11-92500, A, & EP, 962467, A1, & ZA, 9708590, A, & AU, 9743972, A, & NO, 9901449, A, & CN, 1237983, A	7, 8, 12, 14
X	JP, 11-80025, A (中外製薬株式会社), 23. 3月. 1999 (23. 03. 99), 特許請求の範囲, & WO, 98/51329, & EP, 1004313, A1, & AU, 9872369, A, & NO, 9905558, A	1-5, 9-11, 13, 15-17
Y		7, 8, 12
X	WO, 96/03437, A1 (SANDOZ LTD.), 8. 2月. 1996 (08. 02. 96), 特許請求の範囲, 第15頁15行—第17頁26行	1-5, 9-11, 13
Y	& JP, 10-502091, A, 特許請求の範囲, 第21頁18行—第23頁8行 & AU, 9531670, A, & EP, 7739958, A1, & FI, 9700168, A, & NO, 9700356, A, & ZA, 9506331, A, & BR, 9508433, A, & KR, 97704782, A, NX, 9700446, A1	6-8, 12, 14
X	EP, 293158, A2 (MERCK & CO. INC.), 30. 11月. 1988 (30. 11. 88), 特許請求の範囲, 第3頁25行—第4頁19行,	1-5, 9-11, 13
Y	& JP, 63-313800, A, 特許請求の範囲, 第5頁左上欄8行—第6頁左 上欄17行, & DK, 8802853, A	6-8, 12, 14
X	JP, 7-316195, A (日本化薬株式会社), 5. 12月. 1995 (05. 12. 95), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3, 9-11, 13
Y		6-8, 12, 14
X	WO, 96/39184, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 12. 12月. 1996 (12. 12. 96), 特許請求の範囲, & US, 5660826, A, & AU, 9658844, A	1-3, 9-11, 13, . 15, 16
Y		7, 8, 12, 14
X	JP, 2-207099, A (東亜燃料工業株式会社), 16. 8月. 1990 (16. 08. 90), 特許請求の範囲, 第1頁右下欄—第2頁右下欄第7行(ファミリーなし)	1, 3-5, 9-11, 13
Y		7, 8, 12, 14
X	JP, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社), 18. 8月. 1992 (18. 08. 92), 特許請求の範囲, 【0002】 , 【0003】 , 【0010】 (ファミリーなし)	1, 3-5, 9-11, 13, 15, 16
Y		6-8, 12, 14



C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP, 7-165790, A (東燃株式会社), 27. 6月. 1995 (27. 06. 95),	1-5, 9-11, 13
Y	特許請求の範囲, 【0001】 , 【0002】 , 【0005】 , 【0008】 (ファミリーなし)	7, 8, 12, 14
X	WO, 92/17602, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS), 15. 10月. 1992 (15. 10. 92),	1, 3-5, 9-11, 13, 15, 16
Y	特許請求の範囲, 第40頁14行—第49頁6行, & JP, 6-506598, A, 特許請求の範囲, 第13頁左上欄—第15頁左上 欄, & EP, 579758, A1, & US, 5886148, A	6-8, 12, 14
X	WO, 96/33735, A1 (CELL GENESYS, INC.), 31. 10月. 1996 (31. 10. 96),	1, 2, 15-17
Y	特許請求の範囲, 第16頁23行—第17頁27行, 実施例7, & JP, 11-505523, A, 特許請求の範囲, 第24頁10行—第25頁9行, 実 施例7, & EP, 822830, A1, & AU, 9656322, A, & KR, 99008096, A, & US, 6075181, A	7, 8, 12, 14
X	EP, 878201, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 18. 11月. 1998 (18. 11. 98),	1-3
Y	特許請求の範囲, & JP, 8-301887, A, 特許請求の範囲, & WO, 97/27870, A1, & AU, 9715581, A	7, 8, 12, 14
Y	HARDMAN, J. G., et al. (ed.), "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS - 9th ed", McGraw-Hill Companies (U. S. A.), pp. 1528-1529	6
Y	森本茂人ら, 「PTH/PTHrPと中枢神経系」, CLINICAL CALCIUM, 5(12), pp. 50-54 (1995), 全文参照	7, 8, 12
Y	YAMAMOTO, S., et al., "Parathyroid Hormone-Related Peptide- (1-34) [PTHrP-(1-34)] Induces Vasopressin Release from the Rat Supraoptic Nucleus <i>in Vitro</i> through a Novel Receptor Distinct from a Type I or Type II PTH/PTHrP Receptor", Endocrinology, 138(5), pp. 2066-2072 (1997)	14
P X	WO, 00/00219, A1 (中外製薬株式会社), 6. 1月. 2000 (06. 01. 00),	1, 3-5, 9-11, 13, 15-17
P Y	特許請求の範囲, 第2頁最下行—第3頁最下行, & AU, 9942899, A	7, 8, 12, 14
P X	JP, 2000-80100, A (日本たばこ産業株式会社), 21. 3月. 2000 (21. 03. 00),	1-5, 9-11, 13-16
P Y	特許請求の範囲, [0013], [0014], [0055], [0056], 実施例 (ファミリーなし)	6-8, 12, 14



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 99/57139, A2 (SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES S.A.) , 11. 11月. 1999 (11. 11. 99), 特許請求の範囲, 要約, & AU, 9936736, A	1-3, 7, 8, 12
P X	JP, 11-222440, A (旭化成工業株式会社) , 17. 8月. 1999 (17. 08. 99), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3
P Y		14
A	池田恭治, 「副甲状腺ホルモン関連ペプチドの分子生物学」, 日本臨牀, 53(4), 1995, pp. 37-45, はじめに, IV. 悪性腫瘍とPTH-RP	1-17
A	ROSEN, H.N., et al., "The Effect of PTH Antagonist BIM-44002 on Serum Calcium and PTH Levels in Hypercalcemic Hyperparathyroid Patients", Calcif. Tissue Int., 61, pp. 455-459 (1997)	1-17



(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/02011 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00.
39/395, A61P 3/14, 29/00, 37/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04414
- (22) 国際出願日: 2000年7月3日 (03.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/189793 1999年7月2日 (02.07.1999) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 尾形悦郎 (OGATA, Etsuro) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本一丁目30番23号 Tokyo (JP). 佐藤 功 (SATO, Koh) [JP/JP]; 〒104-8301 東京都中央区京橋二丁目1番9号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 小沼悦郎 (ONUMA, Etsuro) [JP/JP]. 恒成利明 (TSUNENARI, Toshiaki) [JP/JP]. 斎藤英美 (SAITO, Hidemi) [JP/JP]. 東由美子 (AZUMA, Yumiko) [JP/JP]; 〒412-8543 静岡
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR DISEASES CAUSED BY PTH OR PTHrP

(54) 発明の名称: PTH又はPTHrPに起因する疾患の治療剤

(57) Abstract: Remedies for diseases caused by PTH or PTHrP. These remedies contain, as the active ingredient, an agonist or an antagonist binding to PTH receptor or PTHrP receptor or a substance binding to a ligand of such a receptor to thereby promote or inhibit the binding of the ligand to the receptor.

(57) 要約:

本発明は、PTH又はPTHrPに起因する疾患の治療剤を提供することを目的とする。本発明は、PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHrPに起因する疾患の治療剤を提供する。

WO 01/02011 A1



明細書

PTH又はPThrPに起因する疾患の治療剤

5 技術分野

本発明は、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone (PTH)) 又は副甲状腺ホルモン関連ペプチド (parathyroid hormone related protein (PThrP)) に起因する疾患の治療剤に関する。

10 背景技術

副甲状腺ホルモン関連蛋白 (parathyroid hormone-related protein, PTHrP) は1987年、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の原因である液性因子の研究から同定された蛋白である。そのN末端側は副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) と共に受容体 (PTH/PThrP受容体) に結合することによってその作用を発現することが知られている。

PThrPは様々な腫瘍組織から産生されていることが報告されているが、広範な正常組織、例えば皮膚、乳腺、子宮、胎盤、骨、平滑筋、心臓、肺、腎、肝臓、脳などにおいても産生され、局所でautocrine/paracrine分泌機構を介して様々な作用を示す。

20 PTH/PThrP受容体はPTHとPThrPの標的臓器である腎や骨に強く発現しているが、その他に大動脈、副腎、脳、乳腺、心臓、消化管、肝臓、肺、骨格筋、卵巣、胎盤、皮膚、胃、子宮などにも発現し、PThrPと極めて類似した分布を示すことが明らかとなった。

PThrPの作用としては、骨における破骨細胞の活性化による骨吸収促進作用、
25 腎の遠位尿細管に作用してカルシウムの再吸収を促進する作用以外に、
1) 上皮細胞におけるカルシウム輸送系 (乳腺上皮、胎盤など) への関与
2) 強力な平滑筋弛緩作用 (子宮、尿管、血管、消化管など)
3) 増殖、分化、発生への関与

が知られているが、上記以外の多くの組織におけるPThrPの生理的役割は不明で

ある。

例えば、中枢神経系 (CNS) において、PTHrPおよびPTH/PTHrPレセプターが発現しているが、その作用についてはほとんど解明されていない。ラット脳の *in situ hybridization* 法により PTHrP mRNA の局在を検討したところ、hippocampus (海馬) 、 cerebellum (小脳) の顆粒細胞層、cerebral cortex (大脳皮質) 、 hypothalamus (視床下部) に存在していることが知られている (Weaverら, Mol Brain Res 28:296-301 1995, Weirら, Proc Natl Acad Sci USA 87:108-112 1990) 。

さらにラット脳の PTH/PTHrP レセプターの分布は PTHrP の分布に一致しており、
10 PTHrP が中枢神経系 (CNS) における局所 autocrine/paracrine factor として作用していると推測される。ラット脳の各部位から調製した細胞膜画分への PTH の結合実験からは、その結合の強さは hypothalamus (視床下部) 、 cerebellum (小脳) 、 cerebral cortex (大脳皮質) の順であった (Harveyら, Peptides 14:1187-1191, 1993) 。さらにラット supraoptic nucleus (SON) スライスを PT
15 HrP (1-34) 刺激すると、arginine vasopressin (AVP) の放出されることが報告され、PTHrP は生体の水分や電解質のホメオスタシスに関与する可能性などが報告されている (Yamamotoら, Endocrinology 139:383-388, 1998, Yamamotoら, Endocrinology 138:2066-2072, 1997) 。このように PTHrP、PTH/PTHrP レセプターは脳に広く分布していることは明らかとなっているが、中枢神経系 (CNS)
20 におけるそれらの生理的役割は不明である。

一方、最近 PTHrP による各種サイトカインの誘導またはサイトカインによる PTH
rP の誘導などが報告され、PTHrP はそれ自身の作用に加え、サイトカインに起因する各種疾患との関わりについてもその関与の可能性が明らかとなった。PTH または PTHrP とサイトカインの crosstalk の可能性を示唆する以下の報告などが知
25 れている。

1) 原発性副甲状腺機能亢進症 (Primary hyperparathyroidism、PTH 高値が原因で起こる) の患者で IL-6 および TNF- α 高値である (Grey A. et al, J Clin Endocrinol Metab 81:3450-5, 1996) 。

2) In vitro 系にて骨芽細胞 (osteoblast) を PTH または PTHrP で刺激すると IL-6

およびLIFの発現が促進される (Pollock JH. et al. J Bone Miner Res 11:75 4-9, 1996)。

3) 滑膜細胞を用いた一連の実験において、PTHRP刺激でIL-6産生が亢進、またTNF- α とIL-1 β はPTHRPの発現を促進するなどPTHRPはpro-inflammatory cytokine cascadeのメンバーである (Funk JL. et al. Endocrinology 138:2665-73, 1997, Funk JL. et al. J Clin Invest 101:1362-71, 1998)。

4) ヒト培養血管内皮細胞においてもTNF- α とIL-1 β はPTHRPの発現を促進する (Biochem Biophys Res Commun 249:339-343, 1998)。

このようにPTHRPによるサイトカインの誘導またはサイトカインによるPTHRPの誘導などが報告され、PTHRPはそれ自身の作用に加え、サイトカイン、特にIL-1 β 、IL-6、TNF- α などのサイトカインに起因する各種疾患との関わりについてもその関与の可能性が明らかとなった。

PTHRPが起因で起こる悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症や癌悪液質において体重の減少、脂肪・筋肉組織重量の低下、食思不振、貧血などの臨床的な特徴が見られ、患者のquality of life (QOL、生活の質) を著しく損なわれている。癌患者のQOLの改善には、抗癌剤などによる原疾患の治療はもちろんのこと著しく低下したQOLを改善する治療法が考えられるが、現在、患者のQOLを改善する十分な治療法はない。現在、QOLの改善効果が認められている治療法としては、強制栄養法と薬物療法がある。強制栄養法は体重は持続するが、効果が長続きしないことから緩和医療の分野では否定的な意見が出始めている (片岡達治 血液・腫瘍科, 36, 500-506, 1998)。また、薬物療法としては主に酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA) が使われているが、MPAの本来の適応症は月経異常症や乳癌である。MPAは食欲増進や脂肪の蓄積などの効果を示すがこれは本来の適応症での副作用を逆にQOLの改善に応用したものである。しかし、MPAはプロゲステロン (黄体ホルモン) 製剤であることから、本来のホルモン作用を示すこと、またその効果も十分ではないことなどから十分な治療剤ではない。

発明の開示

本発明は、PTH又はPTHRPに起因する疾患の治療剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、PThrP産生過剰で起こる悪性腫瘍隨伴性高カルシウム血症以外でPTHまたはPThrPに起因する疾患による症状の改善、中枢神経系疾患の治療およびPThrP-サイトカインカスケードに起因する疾患の治療の可能性について種々検討を行った。その結果、抗PThrP抗体が上記の症状の改善および治療に有効であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

また、抗PThrP抗体は、後述の実施例に示すように、既存の高カルシウム血症治療薬では改善が認められない或いは改善効果の低い症状に対して、高い改善効果が認められた。即ち、上記の症状の改善および治療効果が、単に、血中のカルシウム濃度を下げることによる効果のみに起因するものではないことも同時に見出した。

すなわち、本発明は、PTH受容体又はPThrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPThrPに起因する疾患の治療剤を提供する。疾患は、主として高カルシウム血症以外の、PTHまたはPThrPに起因する疾患である症状に起因するものであるとよい。

また、本発明は、PTH受容体又はPThrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPThrPに起因する疾患による症状を緩和するためのQOL改善剤を提供する。

上記の治療剤およびQOL改善剤が適用される疾患としては、PThrPに起因する悪性腫瘍隨伴性症候群（例えば、消化器障害（下痢、恶心、嘔吐など）、蛋白代謝異常（低アルブミン血症など）、糖代謝異常（耐糖能の低下、インスリン分泌低下など）、脂質代謝異常（高脂血症、血清リポプロテインリバーゼ活性の低下など）、食思不振、血液学的異常（貧血、血栓症、DIC症候群など）、電解質異常（低Na血症、低K血症、高Ca血症など）、免疫不全（感染症など）、疼痛など）、PTHに起因する二次性副甲状腺機能亢進症、原発性副甲状腺機能亢進症などを挙げることができる。

さらに、本発明は、PTH受容体又はPThrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと

受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHRPに起因する中枢神経系疾患の改善剤を提供する。中枢神経系疾患としては、睡眠障害、神経障害（精神分裂病、躁鬱病、神経症、心身症など）、神経症状（恶心、嘔吐、口渴、食欲不振、めまいなど）、脳代謝異常、脳循環異常、自律神経失調症、中枢神経系が関与する各種内分泌系の異常などを挙げることができる。
5

さらにまた、本発明は、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTH rP—サイトカインカスケードに起因する疾患の改善剤を提供する。サイトカインとしては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPO、LIF、TPO、EGF、TGF- α 、TGF- β 、FGF、IGF、HGF、VEGF、NGF、アクチビン、インヒビン、BMPファミリー、TNF、IFNなどを挙げることができる。PTHまたはPTHRP—サイトカインカスケードに起因する疾患は、敗血症、悪液質、炎症、造血系異常や白血病などの血液疾患、カルシウム代謝異常、リウマチなどの自己免疫疾患などを挙げができる。

本発明は、また、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、中枢神経系調節剤を提供する。
20

本発明は、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、サイトカインネットワーク調節剤も提供する。

25 PTH受容体又はPTHRP受容体は、PTH/PTHRPタイプI受容体であってもよい。

PTH受容体又はPTHRP受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を阻害する物質は、抗PTHRP抗体および抗PTH抗体からなる群より選択することができ、これらのうち、抗PTHRP抗体、特に、ヒト型化抗PTHRP抗体が効果的である。

本発明は、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニス

ト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む治療剤である。

本明細書において、「PTH受容体またはPTHRP受容体」とは、PTHまたはPTHRPと結合する受容体を示し、例えば、PTH／PTHRPタイプI受容体（特表平6-506598号5 公報に記載）等が挙げられる。

「PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト作用物質」としては、例えば、PTH(1-34)、PTH(3-34)、PTHRP(1-34)、PTHRP(3-34)、またはこれらのアミド体等が挙げられる。

「PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアンタゴニスト作用物質」とは、PTH10 受容体又はPTHRP受容体に結合することにより、PTHRPがPTH受容体又はPTHRP受容体と結合することを阻害する物質（例えば、PTH受容体又はPTHRP受容体に対するアンタゴニスト（PTH又はPTHRPアンタゴニストともいう）、具体的には、PTH又はPTHRPペプチドの少なくとも一つのアミノ酸を置換、欠失したものやPTH又はPT15 HRPペプチドの部分配列などが挙げられる）をいう。PTH又はPTHRPアンタゴニストとしては、ポリペプチド又は低分子などが挙げられ、例えば、PTHまたはPTHRPに対して拮抗的に受容体に結合する物質として、PTH(7-34)、PTH(8-34)、PTH(9-34)、PTH(10-34)、PTHRP(7-34)、PTHRP(8-34)、PTHRP(9-34)、PTHRP(10-34)、またはこれらの変異体（[Nle₈, 18, D-Trp₁₂, Tyr₃₄]ウシPTH(7-34)NH₂、[Nle₈, 18, Ty15 r₃₄]ウシPTH-(7-34)-amide等）、あるいはこれらのアミド体等が挙げられる。さ20 らに、PTHRPに対して拮抗的にPTHRP受容体に結合する物質として、特開平7-165790号公報、特表平5-509098号公報又はPeptides (UNITED STATES) 1995, 16 (6) 1031-1037、Biochemistry (UNITED STATES) Apr. 28 1992, 31 (16) 4026-4033に記載のPTHRPアンタゴニスト活性を有するポリペプチドが挙げられる。また、上記例示のポリペプチドのうち、少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、付加、25 挿入されたポリペプチドであって、同等のPTH又はPTHRPアンタゴニスト活性を有するものも本発明のPTH又はPTHRPアンタゴニストに含まれる。但し、これらに限定されるものではない。

「リガンド」とは、酵素やレセプターなどに結合する物質をいう。

「PTH受容体又はPTHRP受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を

「阻害する物質」とは、PTH受容体又はPTHrP受容体のリガンド（例えば、PTH、PTHrPなど）に結合することにより、リガンドがPTH受容体又はPTHrP受容体と結合することを阻害する物質（例えば、抗PTH抗体、抗PTHrP抗体など）をいう。抗PTH抗体としては、PTH(1-34)を認識する抗体などが挙げられる。抗PTHrP抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体（W096/33735号公報）又はキメラ抗体（特開平4-228089号公報）などの抗体のほか、ハイブリドーマ#23-57-137-1によって產生される抗体（#23-57-137-1抗体）などが挙げられる。なお、抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であることが好ましい。

「QOL」とは、quality of lifeの略で生活の質を表す。癌患者では体重減少、
10 食思不振、貧血、痛みなどのQOLのパラメーターが著しく損なわれている。

「中枢神経系」とは、脳および脊髄から成る神経系のことをいう。

「PTHまたはPTHrP—サイトカインカスケード」とは、まず、サイトカインカスケードとはサイトカインネットワークの一部を表したもので、一つのサイトカインの情報を第二、第三のサイトカインのメッセンジャーの読みかえることをいう。
15 PTHまたはPTHrP—サイトカインカスケードとはこのサイトカインメンバーの中に
PTHまたはPTHrPが含まれることを意味する。

「サイトカインネットワーク」とは、免疫担当細胞などから産出される因子（サイトカイン）を介した抗原非特異的なネットワーク制御のことをいう。

「ヒト型化抗体」とは、抗体のフレームワークはヒト抗体由来であり、相補性
20 決定領域（CDR）部分はヒト以外の抗体由来（例えばマウス抗体由来など）のものから構成される抗体のことをいう。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願第11-189793号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

「PTH受容体又はPTHrP受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を阻害する物質」として、抗PTHrP抗体を用いる態様について、以下に説明する。

1. 抗PTHrP抗体

本発明で使用される抗PTHrP抗体は、所望の薬理効果を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問うものではない。

本発明で使用される抗PThrP抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗PThrP抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに產生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に产生されるものを含む。この抗体はPThrPと結合することにより、PThrPがPTH／PThrP受容体に結合するのを阻害してPThrPのシグナル伝達を遮断し、PThrPの生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1により產生される#23-57-137-1抗体が挙げられる。なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日付で、FERM BP-5631としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

2. 抗体產生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体產生ハイブリドーマは、以下のようにして作製できる。すなわち、PThrPを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体產生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトPThrPを、Suva, L. J. et al., Science (1987) 237, 893に開示されたPThrP遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、PThrPをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のPThrPタンパク質を公知の方法で精製する。

次に、この精製PThrPタンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、PThrPのN末端の34個のペプチドについて、化学合成により作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的に

はげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的な方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、
10 哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8. 6 53) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U. 1 (Current Topics in
15 Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978)
20 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレンギリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例え

ば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することも
5 できる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG溶液（例えば平均分子量1000-6000程度）を通常30-60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して
10 上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）
15 繼続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよび单一クローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでPTHrPに感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を
20 有するミエローマ細胞と融合させ、PTHrPへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるPTHrPを投与して抗PTHrP抗体產生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からPTHrPに対するヒト抗体を取得してもよい（国際公開番号W0 94/25585号公報、W0 93/12227
25 号公報、W0 92/03918号公報、W0 94/02602号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリド

ーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

5 3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適當なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vand amme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。

10 具体的には、抗PThrP抗体を產生するハイブリドーマから、抗PThrP抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 52 94-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 15 6-159) 等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNAの合成および增幅を行うには、5'-Amp 20 Li FINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。
25 さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認する。

目的とする抗PThrP抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の

抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗PThrP抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発

5 現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（WO 94/11523号公報参照）。

10 また、組換え型抗体の產生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に產生される蛋白質（ヤギβカゼインなど）をコードする遺伝子に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランス
15 ジェニックヤギまたはその子孫が產生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランジエニックヤギから產生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

4. 改変抗体

20 本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト型化（Humanized）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、以下の方法を用いて製造することができる。

本発明に有用なキメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し產生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一

一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照）。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region ; FR）とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により増幅する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることによりヒト型化抗体を得ることができる（EP 239400号公報、WO 96/02576 号公報参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその產生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の薬剤の有効成分として有用である。

本発明に使用できるヒト型化抗体としてはヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。ヒト型化#23-57-137-1抗体は、マウス由来の#23-57-137-1抗体の相補性決定領域を、L鎖についてはヒト抗体HSU03868 (GEN-BANK, Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) 由来の3つのFR断片 (FR1, FR2およびFR3) 並びにヒト抗体S25755 (NBRF-PDB) 由来のFR断片 (FR4) に連結したものであり、H鎖についてはヒト抗体S31679 (NBRF-PDB, Cuisinier AMら, Eur. J. Immunol.

1., 23, 110-118, 1993) のフレームワーク領域と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

なお、ヒト型化#23-57-137-1抗体のL鎖またはH鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日付で、H鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌であるEscherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA /pUC19) についてはFERM BP-5629として、L鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌であるEscherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ /pUC19) についてはFERM BP-5630として、ブダペスト条約に基づきそれぞれ国際寄託されて10いる。

5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、PTHrPに結合し、PTHrPの活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976, Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照）。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される（Huston, J. S. et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結する

ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は
5 所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカーパートをコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合せて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により產生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片
15 も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗PTHrP抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および產生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミ

アンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV 40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させること 10 ができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041 -1043) により発現することができる。

15 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに產生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 437 9) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに產生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

25 本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BH

K、Vero、HeLa細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephadose F.F. (Pharmacia製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

8. 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガンドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用される抗PThrP抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、PThrP (1-34) をコーティングしたプレートに、抗PThrP抗体を含む試料、例えば、抗PThrP抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフェオスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル磷酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用される抗体の活性を確認するには、抗PTHrP抗体の中和活性を測定する。

9. 投与方法および製剤

本発明の薬剤は、PTHまたはPTHrPに起因する疾患の治療剤、PTHまたはPTHrPに起因する疾患による症状を緩和するためのQOL改善剤、PTHまたはPTHrPに起因する中枢神経系疾患の改善剤、PTHまたはPTHrP—サイトカインカスケードに起因する疾患の改善剤、中枢神経系調節剤、サイトカインネットワーク調節剤などとして使用することができる。本発明の薬剤は、上記の用途のいずれか一つあるいは複数を目的として、投与することができる。

本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する薬剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には経肺剤型（例えばネフライザーなどの器具を用いた経肺投与剤）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の例としては、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.01mgから1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01～100000mg/body、好ましくは0.1～10000mg/body、さらに好ましくは0.5～1000mg/body、さらに好ましくは1～100mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗PTHrP抗体を含有する薬剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与時期としては、疾患または症状が生ずる前後を問わず投与してもよく、あるいは体重減少が予測される時に投与してもよい。

本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する薬剤は、常法にしたがって製剤化することができ（Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国）、医薬的に許容される担体や添加物と共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリ

ウム、アルキン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、パクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、
5 ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明の薬剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせて選ばれるが、これらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗PTHrP抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、
10 ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

15

図面の簡単な説明

図1は、高PTHrP血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の血中バソプレシン濃度に与える影響を示す図である。

図2は、高PTHrP血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の尿量に与え
20 る影響を示す図である。

図3は、敗血症モデルマウスにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の延命効果を示す図である。

図4は、高PTHrP血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体およびアレンドロネートの薬効試験結果を示す図である。

図5は、高PTHrP血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の自発運動量に与える影響を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例により、より具体的に説明するが、本発明の範囲はこれ

らの実施例により限定されることはない。

〔実施例1〕

抗PTHrP抗体による低バソプレシン濃度改善効果

生体の水分調節には体液中の各種電解質を至適濃度に維持する調節機構が存在

5 する。電解質と水代謝を調節するホルモンとしてバソプレシン (Vasopressin または別名抗利尿ホルモン:Antidiuretic hormone (ADH)。脳下垂体後葉ホルモンの一種) などが知られている。このホルモンの異常による各種疾患も知られている。例えば脳下垂体後葉機能低下症 (尿崩症) 、バソプレシン分泌異常症などである。

10 これらの症状の中で、特に多飲、多尿、口渴などは特徴的な臨床症状である。

悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症 (HHM) の原因物質としてPTHrPが知られている。悪性腫瘍が産生するPTHrPによるHHMの発症メカニズムは骨吸収促進および腎からのカルシウム再吸收促進による。高カルシウム血症がいったん起こると、バソプレシン不応性の多尿や高カルシウム血症による食欲不振、恶心、嘔吐により15 脱水が生じ、血液の濃縮により高カルシウム血症が助長されることが知られている。

(1) 目的：ヒト腫瘍－ヌードラット移植系の高ヒトPTHrP血症モデル動物を用いて、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体の血中バソプレシン濃度、尿量に対する効果を検討した。

20 (2) 方法：モデル動物としてヒト肺大細胞癌LC-6 ((財) 実験動物中央研究所より購入) を移植したヌードラットを用いた。ヒト肺大細胞癌LC-6を移植されたヌードラットは、腫瘍の増加に伴いPTHrPの産生量が増加するにつれて血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少などの症状を発症する。今回はこの高ヒトPTHrP血症モデル動物において血中バソプレシン濃度の測定を行い、正常ラットと比較25 し、さらにヒト型化モノクローナル抗体が血中バソプレシン濃度に与える影響を評価した。また、尿量の測定と尿量に与えるヒト型化モノクローナル抗体の影響についても評価した。

高ヒトPTHrP血症モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、BALB/c-nu/nuヌードマウス (日本クレア) を用いてin vivoにて継代

しているヒト肺大細胞癌LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。ラットは5週齢雄性F344/N-Jcl-tnuヌードラット（日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後6週齢の動物に腫瘍を移植した。腫瘍塊移植してから1ヶ月半程度後に、血中カルシウム濃度を血中PTHRP濃度の指標にして、血中カルシウム濃度が上昇しつつ体重減少している動物を高ヒトPTHRP血症モデル動物とし薬効評価に用いた。血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

バソプレシン濃度測定の実験では、上記の方法で作製、群分けした高PTHRP血症モデル動物に、3mg/kgのPTHRPに対するヒト型化モノクローナル抗体を週1回、10日、7日、14日、21日、28日、35日目に尾静脈内に投与した。アレンドロネートは2.5mg/kgを週2回、0日、3日、7日、10日、14日、17日、21日、24日、28日、31日、35日、38日に尾静脈内に投与した。対照群にはリン酸バッファー生理食塩水（PBS）を0日、7日、14日、21日、28日、35日目に尾静脈内に投与した。実験期間中、移植腫瘍塊の明らかな脱落例は結果の集計より除外した。

血中バソプレシン濃度の測定は、42日目に下行大動脈から採血しEDTAにて分離した血漿を用いた。採血時に移植腫瘍が明らかに脱落していた個体のデータは集計から除外したため、採血時の各群の数は、PTHRPに対するヒト型化モノクローナル抗体投与群で12匹、アレンドロネート投与群で3匹、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）投与群で8匹、正常ラット群5匹であった。測定は、血漿を用いたRIA法にて行った。

尿量測定の実験では、先に示した方法で作成、群分けした高ヒトPTHRP血症モデル動物に、3mg/kgのPTHRPに対するヒト型化モノクローナル抗体またはアレンドロネート5mg/kgを尾静脈内に投与した。対照群にはリン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に投与した。投与後13日目の朝から14日目の朝にかけての24時間の尿を集め、重量と比重を測定し尿体積を算出した。

（3）結果：高ヒトPTHRP血症モデル動物において、血中バソプレシン濃度が低下していることが明らかになった。ヒト型化モノクローナル抗体は、高PTHRP血症モデルにおける低下した血中バソプレシン濃度を改善した（図1）。さらにヒ

ト型化モノクローナル抗体は、高ヒトPTHRP血症モデル動物における多尿の状態を改善する効果が認められた（図2）。このことより、ヒト型化抗PTHRPモノクローナル抗体は血中のバソプレシン濃度を正常化を通じて脱水状態を回復させる効果を有することが判明した。

5 [実施例2] 敗血症モデルにおける抗PTHRP抗体の延命効果

ヒト型化抗PTHRPモノクローナル抗体の敗血症治療薬の可能性（敗血症治療薬）

敗血症(sepsis)は生体内の感染病巣から細菌や真菌などの微生物およびその代謝産物が持続的に血液中に移行している状態である。臨床症状としては発熱、悪寒・戦慄、頻脈、意識障害などを呈し、進行すれば敗血症性ショックとなり、10 種々の臓器不全、例えば循環不全、播種性血管内凝固症候群(DIC)、成人呼吸促迫症候群(ARDS)および多臓器不全(MOF)などを合併し、なお死亡率の高い疾患である。

これら種々の臨床症状は細菌由来のエンドトキシンなどが引き金となり、敗血症カスケードとよばれる一連の反応が進行することによって引き起こされる。その中でもグラム陰性菌の細胞壁を構成するエンドトキシン(LPS:lipopolysaccharide、リポ多糖類)の脂質部分は強い生理作用を有していることが知られている。近年、敗血症の解明がサイトカインレベルで研究され、このLPSによって引き起こされる敗血症性ショックにおいて血清中にTNF、IL-1、IL-6、IL-8、IFN γ などのサイトカインが上昇してくることが明らかとなった。

20 一方、Funkらによりマウスに多量のLPSを投与すると様々なサイトカインが产生・誘導されると同時に副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHRP)が产生・誘導されることが報告された。さらに、このモデルにヤギおよびウサギ抗PTHRP抗体を投与すると延命効果が得られることが報告された(Mol Med 2, 204, 1996)。

この効果がヒト型化抗PTHRPモノクローナル抗体でも得られるかどうか延命効果25 を指標にして追試を行い、ヒト型化抗PTHRPモノクローナル抗体の敗血症治療薬への適応性を検討した。

敗血症モデルに対するヒト型化抗PTHRP抗体の効果

(1) 目的：LPSにより誘発される敗血症モデルに対するヒト型化抗PTHRPモノクローナル抗体の効果の検討を行い、適応拡大をはかる。

(2) 方法：Funkらの方法に準じて行った。

1. モデル動物には1週間の馴化の後6週令の正常マウスJcl:ICR（日本クレア）を用い、LPS投与により敗血症発症マウスを作成した。マウスに700, 800, 900 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ のLPS (*E. coli* 055:B5 (Difco)) を腹腔内投与し (n=3) 、死亡状況を経時的に観察した。48時間で80%以上死ぬ濃度のLPS投与量として800 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ を選択した。

2. ヒト型化抗PTHrPモノクローナル抗体（L鎖として後述のバージョンqを含む抗体）の薬効評価は、以下の方法で行った。ヒト型化抗PTHrPモノクローナル抗体1000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ を尾静脈投与すると同時に（同時投与群：n=12）、あるいは1時間後（前投与群：n=13）にLPS 800 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ を腹腔内投与した。対照群には、LPS 800 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ のみを投与した（n=13）。その後の死亡状況を経時的に（0～72時間）観察し、対照群に対するヒト型化抗PTHrPモノクローナル抗体投与群の延命効果を検討した。

(3) 結果：いずれの群においてもLPS投与後36時間後に多数の死亡例が見られた。48時間後の生存率は、control群：15.4%、同時投与群：33.3%、pre投与群：30.8%、72時間後ではcontrol群：7.7%、同時投与群：25.0%、pre投与群：30.8%であり、ヒト型化抗PTHrPモノクローナル抗体の同時にあるいは前投与により、LPS誘発敗血症モデルにおいて延命効果を示した（図3）。このことから、ヒト型化抗PTHrPモノクローナル抗体は敗血症治療薬としての有用性が示唆された。

〔実施例3〕高ヒトPTHrP血症モデルにおける抗PTHrP抗体のQOL改善効果
高ヒトPTHrP血症モデルにおいてヒト型化抗PTHrP抗体は血中カルシウム濃度低下作用に加え著しい体重回復や自発運動量の増加、摂食量の増加を示すことなどを本発明者らは既に明らかとしてきた（特開平11-92500号）。このような、体重、自発運動量、摂食量などのQOLのパラメーターの改善効果は血中カルシウム濃度を改善または正常値に是正することによってもたらされるものなのか、それ以外の因子を介するものなのかという疑問が残る。そこで、本発明者らは、血中カルシウム濃度の低下と体重増加、自発運動量、および摂食・摂水量との関係を解析した。簡単に実験を説明すると高PTHrP血症モデル動物の作製はヌードラットにPTHrP産生腫瘍、ヒト肺大細胞癌株LC-6を皮下移植して作製し、このモ

ル動物に、3mg/kgのPTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体または対照群としてビスフォスフォネート製剤であるアレンドロネート5mg/kg投与群を静脈内に投与（単回投与）した。投与後、その動物の血中イオン化カルシウム(iCa)濃度、体重、摂食・摂水量を測定した。この実験で得られたそれぞれのパラメーターの
5 結果より積算値（薬物投与開始時点をゼロレベルとし、グラフより面積を算出したもの）を算出した。ただし、体重についてはそのままの値を用いた。グラフは横軸に血中カルシウム濃度低下の積算値を縦軸に各種パラメーターの積算値を取って作成した。対照薬としてはアレンドロネート5mg/kg投与群とした。その結果を以下に示す。血中カルシウム濃度低下と比較したいずれのパラメーターにおいてもヒト型化抗PTHrP抗体で得られた直線とアレンドロネートで得られた直線はその傾きが異なることが判明した（図4 A、B、CおよびD）。特に、自発運動量（図4 B）、摂水量（図4 D）は直線の傾きの正負が逆転していた。このことは、ビスフォスフォネート製剤であるアレンドロネートによる血中カルシウム濃度低下作用に伴って認められるQOL改善効果に比べヒト型化抗PTHrP抗体で認められる
10 QOL改善効果は著しいことを示唆している。このことより、PTHrPは悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症の原因物質であるばかりでなく何らかの、カルシウム以外のメカニズムを介して悪性腫瘍随伴症候群の原因となっている可能性が示唆された。

また、抗PTHrP抗体は、既存の高カルシウム治療薬に比べ著しいQOL改善効果を有していることが明らかとなった。

20 [実施例4]

（1）目的：高PTHrP血症モデル動物の自発運動に対する、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体の効果を検討した。

（2）方法：高PTHrP血症モデル動物の作製はヌードラットにPTHrP産生腫瘍、ヒト肺大細胞癌株LC-6を皮下移植して作製した。高PTHrP血症モデル動物に、PBS
25 （対照）または5mg/kgのPTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体を静脈内に投与（単回投与）した。自発運動量の測定はラットを個別ポリケージに入れ自発運動量測定装置、ANIMEXを用いてその振動カウントを測定した。測定はPBS投与の個体は投与1、3、5日目、抗体投与の個体は投与0（投与前値）、2、4、6日目に行い。時間は午後7時から翌朝午前7時までの12時間とした。

(3) 結果：結果は1時間毎にカウントを集計した。正常ラットの自発運動のパターンは周期的なリズムを持っていることは知られている。本高PTHrP血症モデルにおいては、自発運動の周期性は見られるものの、そのパターンは不規則であることが判明した（PBS投与個体の結果より）。一方、抗体投与した個体においては、まず自発運動量の増加と共に、その自発運動の周期性のパターンが顕著になることが判明した（図5）。

(4) 考察：自発運動量、特にその運動の周期性などは、中枢の運動神経などに支配されている。今回実施した、高PTHrP血症モデルにおいて、運動量の低下に加え、その周期性が乱れており、高PTHrP血症によってもたらされる中枢神経系への影響が推測された。高PTHrP血症モデルにPTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体を投与することによりの自発運動の周期性が顕著になったことから、本抗体は高PTHrP血症によってもたらされる中枢神経系への影響を改善する効果を有していることが判明した。

〔考察〕

15 1. 悪性腫瘍随伴性症候群

悪性腫瘍に伴う随伴性症候群としては、消化器障害（下痢、恶心、嘔吐など）、蛋白代謝異常（低アルブミン血症など）、糖代謝異常（耐糖能の低下、インスリン分泌低下など）、脂質代謝異常（高脂血症、血清リポプロテインリパーゼ活性の低下など）、食思不振、血液学的異常（貧血、血栓症、DIC症候群など）、20 電解質異常（低Na血症、低K血症、高Ca血症など）、免疫不全（感染症など）、疼痛などを挙げることができる。これら随伴性症候群の発生機序は明らかではないが、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症で認められる諸症状の多くは重複している。前記実施例で示したように、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症を発生しているモデル動物に、高カルシウム血症の原因物質であるPTHrPの中和抗体を投与すると、血中カルシウム正常化のみならず運動量の増加、摂食・摂水量の増加、多尿の改善、バソプレシンの正常化などの症状改善が認められる。図4で明らかのように、これらの改善効果は、単に血中カルシウムの濃度の低下（正常化）による二次的な効果というだけでは説明がつかず、血中カルシウム濃度の正常化効果とは関係のない、抗PTHrP抗体等のPTHrPアンタゴニストが有する特徴的及び特異

的な作用であるといえる。以上の結果より、悪性腫瘍随伴性症候群の原因物質の一つとしてPTHrPが考えられ、これら諸症状は、各種臓器で発現しているPTH／PTHrPの受容体を介して惹起されると考えられる。従って、PTH／PTHrPの受容体への信号を遮断する作用物質は、悪性腫瘍随伴性症候群の症状を改善すると考えら
5 れる。

2. QOL改善剤

悪性腫瘍随伴性症候群、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、原発性副甲状腺機能亢進症や二次性副甲状腺機能亢進症で認められる消化器障害（下痢、恶心、嘔吐など）、蛋白代謝異常（低アルブミン血症など）、糖代謝異常（耐糖能の低下、
10 インスリン分泌低下など）、脂質代謝異常（高脂血症、血清リポプロテインリパーゼ活性の低下など）、食思不振、血液学的異常（貧血、血栓症、DIC症候群など）、電解質異常（低Na血症、低K血症、高Ca血症など）、免疫不全（感染症など）、疼痛などの諸症状は、前記疾患で一つまたは複数の疾患が共通して認められる。これらの諸症状は、患者のQOLを著しく低下させる。前記疾患のうち
15 悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、原発性副甲状腺機能亢進症や二次性副甲状腺機能亢進症は、PTHまたはPTHrPが原因物質であることが明らかになっている。

「1. 悪性腫瘍随伴性症候群」で述べたように、PTHrPの中和抗体を投与すると、
20 血中カルシウム正常化のみならず運動量の増加、摂食・摂水量の増加、多尿の改善、バソプレシンの正常化などの症状改善が認められる。以上の結果より、悪性腫瘍随伴性症候群の原因物質の一つとしてPTHrPが考えられ、これら諸症状は、各種臓器で発現しているPTH／PTHrPの受容体を介して惹起されると考えられる。従って、PTH／PTHrPの受容体への信号を遮断する作用物質は、悪性腫瘍随伴性症候群、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、原発性副甲状腺機能亢進症や二次性副甲状腺機能亢進症等の疾患でのQOLの低下を改善すると考えられる。
25

3. 中枢神経系

悪性腫瘍随伴性症候群、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症、原発性副甲状腺機能亢進症や二次性副甲状腺機能亢進症では、食思不振・口渴感や行動量の低下などの中枢神経への作用が認められる。前述のように、PTHrPの中和抗体を投与するところにより、運動量の増加、摂食・摂水量の増加、多尿の改善、バソプレシン

の正常化などの症状改善が認められる。従って、中枢神経に起因する症状の原因物質の一つとしてPThrPが考えられ、これら症状は、中枢神経系で発現しているPTH/PThrPの受容体を介して惹起されると考えられる。故に、PTH/PThrPの受容体への信号を遮断する作用物質は、中枢神経に起因する症状を改善すると考えれる。
5 また、中枢神経系疾患としては、睡眠障害、神経障害（精神分裂病、躁鬱病、神経症、心身症など）、神経症状（恶心、嘔吐、口渴、食欲不振、めまいなど）、脳代謝異常、脳循環異常、自律神経失調症、中枢神経系が関与する各種内分泌系の異常などを挙げることができる。中枢神経系（CNS）において、PThrPおよびPTH/PThrPレセプターが発現しているが、その作用についてはほとんど解明されて
10 いない。ラット脳のin situ hybridization法によりPThrP mRNAの局在を検討したところ、hippocampus（海馬）、cerebellum（小脳）の顆粒細胞層、cerebral cortex（大脳皮質）、hypothalamus（視床下部）に存在していることが知られている（Weaverら、Mol Brain Res 28:296-301 1995, Weirら、Proc Natl Acad Sci USA 87:108-112 1990）。

15 さらにラット脳のPTH/PThrPレセプターの分布はPThrPの分布に一致しており、PThrPが中枢神経系（CNS）における局所autocrine/paracrine factorとして作用していると推測される。ラット脳の各部位から調製した細胞膜画分へのPTHの結合実験からは、その結合の強さはhypothalamus（視床下部）、cerebellum（小脳）、cerebral cortex（大脳皮質）の順であった（Harveyら、Peptides 14:1187-1191, 1993）。さらにラットsupraoptic nucleusスライスをPThrP（1-34）刺激すると、arginine vasopressin（AVP）の放出されることが報告されている（Yamamotoら、Endocrinology 139:383-388, 1998, Yamamotoら、Endocrinology 138:2066-2072, 1997）。このようにPThrPおよびPTH/PThrP受容体が、
20 脳に広く分布していること、および前記各疾患で認められる神経症状と症状が共通することから中枢神経系疾患のうちの幾つかの発生原因として、PTHまたはPThrPの関与が考えられる。従って、PTH/PThrPの受容体への信号を遮断する作用物質は、中枢神経系疾患を改善すると考えられる。

4. サイトカインカスケード

先に述べた通り、PThrPとサイトカインとのクロストークの可能性を示唆する以下の報告などが知られている。

1) 原発性副甲状腺機能こう進症 (Primary hyperparathyroidism、PTH高値が原因で起こる) の患者でIL-6およびTNF α 高値である (Grey A. et al, J Clin Endocrinol Metab 81:3450-5, 1996) 。

2) In vitro系にて骨芽細胞 (osteoblast) をPTHまたはPThrPで刺激するとIL-6およびLIFの発現が促進される (Pollock JH. et al, J Bone Miner Res 11:75 4-9, 1996) 。

3) 滑膜細胞を用いた一連の実験において、PThrP刺激でIL-6産生がこう進、またTNF- α とIL-1 β はPThrPの発現を促進するなどPThrPはpro-inflammatory cytokine cascadeのメンバーである (Funk JL. et al, Endocrinology 138:2665-7 3, 1997、 Funk JL. et al, J Clin Invest 101:1362-71, 1998) 。

4) ヒト培養血管内皮細胞においてもTNF- α とIL-1 β はPThrPの発現を促進する (Biochem Biophys Res Commun 249:339-343, 1998) 。

15 また、LPS誘導性敗血症モデルでは、各種サイトカインのみならずPThrP産生が誘導されることが知られている。実施例で示すごとく、PThrPの中和抗体は、LPS誘導性敗血症モデルで延命効果が認められる。

20 このようにPThrPによるサイトカインの誘導またはサイトカインによるPThrPの誘導によるPTHまたはPThrP-サイトカインカスケードが、病態の発生に関与すると考えられる。また、PThrPによる各種臓器ならびにサイトカイン産生誘導のシグナルを遮断することで、LPS誘導性敗血症モデルで延命効果が認められことから、PTH/PThrPの受容体への信号を遮断する作用物質は、PTHまたはPThrP-サイトカインカスケードに起因する疾患と考えられる敗血症、悪液質、炎症、造血系異常や白血病などの血液疾患、カルシウム代謝異常、リウマチなどの自己免疫疾25 患などの治療剤となり得る。

[参考例 1]

抗PThrP(1-34)マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒトPThrP(1-34)に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#23-57-154および#23-57-137-1は、以下の通り作製した (Sato, K. et al., J. Bone Min

er. Res. 8, 849-860, 1993)。なお、ヒトPThrP(1-34)のアミノ酸配列を配列番号75に示す。

免疫原として使用するために、PThrP(1-34) (Peninsula 製) とキャリアータンパクであるサイロクロブリンをカルボジイミド (Dojinn) を用いて結合した。

5 サイロクロブリンと結合したPThrP(1-34)を透析し、タンパク濃度として2 mg/ml となるように調製した後、フロイントアジュバント (Difco) と1:1で混合し、エマルジョン作製後、16匹の雌性BALB/Cマウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり100 μgを11回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

10 免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、マウス尾静脈より採血し、血清分離後RIAバッファーで希釈した抗血清と¹²⁵I標識PThrP(1-34)を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアータンパクを結合していないPThrP(1-34)を動物あたり50 μgを最終免疫した。

15 最終免疫3日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株P3x63Ag8U.1を50%ポリエチレングリコール4000を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を2×10⁴/ウェルの細胞数で85枚の96穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別はHAT培地を用いて行った。

20 ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT培地中に生育の認められた穴の培養上清を固相化RIA法にてPThrP認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15%FCSを含むRPMI-1640 培地にOPI-supplement (Sigma) を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PThrP(1-34)との結合能の強いクローン#23-57-154 および#23-57-137-1を得た。

25 なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、FERM BP-5631としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

[参考例2] ヒトPThrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体のV領域

をコードするDNAのクローニング

ヒトPTHRP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1の可変領域をコードするDNAを次の様にしてクローニングした。

(1) mRNAの調製

5 ハイブリドーマ#23-57-137-1からのmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech社) を用いて調製した。ハイブリドーマ#23-57-137-1の細胞を抽出バッファーで完全にホモジナイズし、キット添付の処方に従い、oligo (dT)-Cellulose Spun Column にてmRNAを精製し、エタノール沈殿をおこなった。mRNA沈殿物を溶出バッファーに溶解した。

10 (2) マウスH鎖V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製および増幅

(i) #23-57-137-1抗体H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトPTHRPに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法には5'-Ampli FINDER RACE kit (CLONETECH社) を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA合成に使用するプライマーは、マウスH鎖定常領域（C領域）とハイブリダイズするMHC2プライマー（配列番号1）を用いた。前記のようにして調製したmRNA約2 μgを鋳型としてMHC2プライマー10pmoleを加え、逆転写酵素と52°C、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。

6 N NaOHでRNAを加水分解（65°C、30分間）した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。T4DNAリガーゼで37°Cで6時間、室温で16時間反応することにより、合成したcDNAの5'末端にAmpli FINDER Anchor（配列番号42）を連結した。これを鋳型としてPCRにより増幅するためのプライマーとしてAnchorプライマー（配列番号2）およびMHC-G1プライマー（配列番号3）（S. T. Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991）を使用した。

PCR溶液は、その50 μl中に10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl₂、2.5 ユニットのTaKaRa Taq（宝酒造）、10pmole のAnchorプライマー、並びにMHC-G1プライマー及びAmpli FINDE

R Anchor を連結したcDNAの反応混合物 1 μ lを含有する。この溶液に50 μ lの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model 480J (Perkin Elmer) を用い、94°Cにて45秒間、60°Cにて45秒間、72°Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。

(ii) #23-57-137-1 抗体L鎖V領域のcDNAのクローニング

ヒトPTHRPに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法には5'-Ampli Finder RACE Kit (Clonetech) を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA合成に使用するプライマーは、oligo-dTプライマーを用いた。前記のように調製したmRNA約2 μ gを錆型としてoligo-dTプライマーを加え、逆転写酵素と52°C、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。6N NaOHでRNAを加水分解 (65°C、30分間) した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。合成したcDNAの5'末端に前記Ampli FINDER Anchor をT4DNAリガーゼで37°Cで6時間、室温で16時間反応させることにより連結した。

マウスL鎖入鎖定常領域の保存配列からPCRプライマーMLC (配列番号4) を設計し、394 DNA/RNA Synthesizer (ABI社) を用いて合成した。PCR溶液は、その100 μ l中に10 mM Tris-HCl (pH8.3) 、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 、1.5Mm MgCl₂ 、2.5 ユニットの AmpliTaq (PERKIN ELMER) 、50pmole のAnchorプライマー (配列番号2) 、並びにMLC (配列番号4) およびAmpli FINDER Anchorを連結したcDNAの反応混合物1 μ lを含有する。この溶液に50 μ lの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model480J (Perkin Elmer) を用い、94°Cにて45秒間、60°Cにて45秒間、72°Cにて2分間の温度サイクルで35回行った。

(3) PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を、3% Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H鎖V領域として約550bp 長、L鎖V領域として約550bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit (BI0101) を用い、キット添付の処

方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液20 μlに溶解した。得られたDNA溶液1 μlを制限酵素XmaI (New England Biolabs)により37°Cで1時間消化し、次いで制限酵素EcoRI (宝酒造)により37°Cで1時間消化した。この消化混合物をフ
5 ェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

こうして、5'-末端にEcoRI 認識配列を有し、3'-末端にXmaI認識配列を有するマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-XmaIDNA断片とEcoRI 及びXmaIで消化することにより調製した
10 pUC19ベクターをDNAライゲーションキットver. 2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16°Cで1時間反応させ連結した。次に10 μlの上記連結混合物を大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μlに加え、この細胞を氷上で15分間、42°Cにて1分間、さらに氷上で1分間静置した。次いで300 μlのSOC
15 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)を加え37°Cにて30分間インキュベートした後、100 μg/ml又は50 μg/mlのアンピシリン、0.1mMのIPTG、20 μg/mlのX-galを含むLB寒天培地または2xYT寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)
y 上にこの大腸菌をまき、37°Cにて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得
20 た。

この形質転換体を100 μg/ml又は50 μg/mlのアンピシリンを含有するLB培地または2×YT培地 2 mlで37°Cにて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機PI-100Σ (クラボウ) 又はQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

25 (4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (ABI社Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号5) 及びM13 Primer RV (宝酒造) (配列番号6) を用い、両方向

の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1H04、L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1L24と命名した。プラスミドMBC1H04およびMBC1L24に含まれるマウス#23-57-137-1抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列（対応するアミノ酸配列を含む）をそれぞれ配列番号57、65に示す。これらのアミノ酸配列を、H鎖V領域の断片については配列番号46、L鎖V領域の断片については配列番号45に示す。

なお、前記プラスミドMBC1H04およびMBC1L24を有する大腸菌はEscherichia coli JM109 (MBC1H04) およびEscherichia coli JM109 (MBC1L24)として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109 (MBC1H04)についてはFERM BP-5628、Escherichia coli JM109 (MBC1L24)についてはFERM BP-5627としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

15 (5) ヒトPTHRPに対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1のCDRの決定

H鎖V領域およびL鎖V領域の全般の構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, E. A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dep t. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトPTHRPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示すごとく決定した。

なお、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号59～61に示し、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号62～64に示した。

表 1

V領域	配列番号	CDR1	CDR2	CDR3
H鎖V領域	5 7	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	6 5	23-34	50-60	93-105

〔参考例3〕キメラ抗体の構築

(I) キメラ抗体H鎖の構築

(i) H鎖V領域の構築

5 ヒトH鎖C領域C γ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、クローニングしたマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1-S1（配列番号7）はV領域のリーダー配列の5'-側をコードするDNAにハイブリダイズし、且つKozak コンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）及び制限酵素Hind IIIの認識配列を有するように設計した。

10 前方プライマーMBC1-a（配列番号8）はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライスドナー配列及び制限酵素BamHIの認識配列を有するように設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq（宝酒造）を用い、50μlの反応混合液に錆型DNAとして0.07μgのプラスミドMBC1H04、プライマーとしてMB C1-aおよびMBC1-S1をそれぞれ50pmole₋、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTP含む条件で添付緩衝液を使用して50μlの鉱油を上層し、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

15 437bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEAN II Kit (BI0 20 101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20μlに溶解した。得られたDNA溶液1μlを制限酵素BamHI、Hind III（宝酒造）により37℃ 1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

25 上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むHind

III-BamHI DNA断片をHind IIIおよびBamHIで消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するためプライマーM13 Primer M4 およびM13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にHind III認識配列及びKozak 配列、3'-側にBamHI認識配列を持つプラスミドをMBC1H/pUC19 と命名した。

(ii) c DNAタイプのマウス-ヒトキメラH鎖の作製のためのH鎖V領域の構築
ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。H鎖V領域のための後方プライマーMBC1HVS2 (配列番号9) はV領域のリーダー配列の最初をコードする配列の2番のアスパラギンをグリシンに変換し、且つKozak コンセンサス配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987) 並びにHind IIIおよびEcoRI 認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2 (配列番号10) はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、C領域の5'-側の配列をコードしApa I およびSmaI認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、50 μ l の反応混合液に鑄型DNAとして0.6 μ g のプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taq を2.5U、0.25mMのdNTPを含む条件で添付の緩衝液を使用して50 μ l の鉱油を上層して94°C 1分間、55°C 1分間、72°C 1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1% Sea Kem GTG アガロース (FMC Bio Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。456bp 長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BI0101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液20 μ l に溶解した。

得られたDNA溶液1 μ l を制限酵素EcoRI およびSmaI (宝酒造) により37°Cで

1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-SmaI DNA断片をEcoRI およびSmaIで消化することにより調製したpUC19ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4 及びM13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A (Perkin-Elmer) により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にEcoRI およびHind III認識配列並びにKozak配列、3'-側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをMBC1Hv/pUC19と命名した。

(iii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C γ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域IgG1のゲノムDNA (N. 15 Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクターDHFR- \triangle E-Rvh-PM-1-f (W092/19759参照) と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域およびヒト抗体L鎖 κ 鎖C領域のゲノムDNAをコードする発現ベクターRV1-PM1a (W092/1975 9参照) とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19 20 のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRvh-PM1f-cDNAと命名した。

DHFR- \triangle E-Rvh-PM-1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind I II部位、およびEF-1 α プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるE coRI 部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域及び 25 ヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。

pRvh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-Ba mHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI 部位が欠失したDHFR- \triangle E-R vh-PM1-fをHind IIIおよびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに

連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含み、5'-末端にEcoRIおよびHind III認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。

10 プラスミドMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含むDNA断片を、EcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現ベクターpCOS1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。なお、発現ベクターpCOS1は、HEF-PMh-g γ 1(WO92/19759参照)から、EcoRIおよびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHIアダプター(宝酒造)を連結することにより構築した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラスミドMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体H鎖配列を含むDNA断片を、EcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現20プラスミドpCHO1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCHO1と命名した。なお、発現ベクターpCHO1は、DHFR-△E-rvH-PM1-f(WO92/19759参照)から、EcoRIおよびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor(宝酒造)を連結することにより構築した。

(2) ヒトL鎖定常領域の構築

25 (i) クローニングベクターの作製

ヒトL鎖定常領域を含むpUC19ベクターを構築するために、Hind III部位欠失pUC19ベクターを作製した。pUC19ベクター2 μ gを20mM Tris-HCl(pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8UのHind III(宝酒造)を含有する反応混合液20 μ l中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールお

およびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿により回収した。

回収したDNAを50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6 UのKlenowフラグメント (GIBCO BRL) を含有する50 μl の反応混合液中で室温にて20分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクターDNAをエタノール沈殿により回収した。
5

回収したベクターDNAを50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl₂、1 mM ATP、1 mM DTT、5 % (v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 UのT4 DNAリガーゼ (GIBCO BRL) を含有する反応混合液10 μl 中で16°Cで2時間反応させ、自己10 連結させた。反応混合液5 μl を大腸菌JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μl に加え、氷上で30分間静置した後、42°Cにて1分間、さらに氷上で1分間静置した。SOC培地500 μl を加えて、37°Cで1時間インキュベーションした後、X-gal とIPTGを表面に塗布した2×YT寒天培地 (50 μg/mlアンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., 15 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にまき、37°Cで一夜培養して形質転換体を得た。

形質転換体を、50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地20mlで37°C一夜培養し、菌体画分からPlasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付の処方に従ってプラスミドDNAを精製した。精製したプラスミドをHind IIIで消化し、Hind III20 部位が欠失していることを確認したプラスミドをpUC19 ΔHind IIIと命名した。

(ii) ヒトL鎖入鎖C領域をコードする遺伝子の構築

ヒト抗体L鎖入鎖C領域は、Mcg+ Ke+ Oz-、Mcg- Ke- Oz-、Mcg- Ke- Oz+、Mc25 g- Ke+ Oz-の少なくとも4種類のアイソタイプが知られている (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) 。#23-57-137-1マウスL鎖入鎖C領域と相同性を有するヒト抗体L鎖入鎖C領域をEMBLデータベースで検索した結果、アイソタイプがMcg+ Ke+ Oz- (accession No. X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987) のヒト抗体L鎖入鎖が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1マウスL鎖入鎖C領域との相同性はアミノ酸配列で64.4%、塩基配列で73.4%であった。

そこで、このヒト抗体L鎖&鎖C領域をコードする遺伝子の構築をPCR法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer(ABI社)を用いて行った。HLAMB1(配列番号11)およびHLAMB3(配列番号13)はセンスDNA配列を有し、HLAMB2(配列番号12)およびHLAMB4(配列番号14)はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23bpの相補的配列を有する。

外部プライマーHLAMBS(配列番号15)、HLAMBR(配列番号16)はHLAMB1、HLAMB4とそれぞれ相同な配列を有しており、またHLAMBSはEcoRI、Hind III、BlnI認識配列を、HLAMBRはEcoRI認識配列をそれぞれ含んでいる。第一PCRでHLAMB1-HLAMB2とHLAMB3-HLAMB4の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

PCRはTaKaRa Ex Taq(宝酒造)を使い、添付の処方に従って行った。第一PCRでは、5 pmoleのHLAMB1および0.5pmoleのHLAMB2と5 UのTaKaRa Ex Taq(宝酒造)とを含有する100 μlの反応混合液、あるいは0.5pmoleのHLAMB3および5 pmoleのHLAMB4と5 UのTaKaRa Ex Taq(宝酒造)とを含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行った。

第二PCRは、反応液を50 μlずつ混合し、50 μlの鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで3回行った。

第三PCRは、反応液に外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを各50pmoleずつ添加し、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

第三PCR産物のDNA断片を3%低融点アガロースゲル(NuSieve GTG Agarose, FMC)で電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、添付の処方に従つてゲルから回収、精製した。

得られたDNA断片を50mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100mM NaCl、8 UのEcoRI(宝酒造)を含有する20 μlの反応混合液中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA溶液8 μlに溶

解した。

プラスミドpUC19 ΔHind III 0.8 μgを同様にEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収した。消化したプラスミドpUC19 ΔHind IIIを50 mM Tris-HCl (pH9.0)、1 mM MgCl₂、アルカリホスフ5 アターゼ (E.coli C75, 宝酒造) を含有する反応混合液50 μl 中で37℃、30分間反応させ脱リン酸処理 (BAP処理) した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿により回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10 μl に溶解した。

上記のBAP処理したプラスミドpUC19 ΔHind III 1 μl と先のPCR産物4 μl 10 をDNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌JM109 コンピメント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2 mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

上記プラスミドについて、クローニングされたDNAの塩基配列の確認を行った。15 塩基配列の決定には373A DNA sequencer (ABI 社) を用い、プライマーにはM13 Primer M4 およびM13 Pricer RV (宝酒造) を用いた。その結果、クローニングされたDNAの内部に12bpの欠失があることが判明した。このDNAを含むプラスミドをCλΔ/pUC19と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマーHCLMS (配列番号17)、HCLMR (配列番号18) を新たに合成し、PCRで再度正しいDNAの構築を行った。

第一PCRで欠失DNAを含むプラスミドCλΔ/pUC19を鋳型とし、プライマーHLAMBSとHCLMR、HCLMSとHLAMB4で反応を行った。PCR産物をそれぞれ精製し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMB4を添加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

25 第一PCRでは、鋳型としてCλΔ/pUC19 0.1 μg、プライマーHLAMBSおよびHCLMR 各50pmole、あるいはHCLMS およびHLAMB4各50pmole、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する100 μl の反応混合液を用い、50 μl の鉱油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

PCR産物HLAMBS-HCLMR (236bp) 、HCLMS-HLAMB4 (147bp) をそれぞれ 3 %低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。第二PCRでは精製DNA断片各40ng、1 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する20 μ l の反応混合液を用い、25 μ l の鉱油を上層して94°C 5 にて1分間、60°Cにて1分間、72°Cにて1分間の温度サイクルを5回行った。

第三PCRでは、第二PCR反応液2 μ l 、外部プライマーHLAMBS、HLAMB4各50pmole 、5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鉱油を上層した。PCRは、94°Cにて1分間、60°Cにて1分間、72°Cにて10 1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物である357bp のDNA断片を3 %低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。

得られたDNA断片0.1 μ g をEcoRI で消化した後、BAP処理したプラスミド pUC19 Δ Hind IIIにサブクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換し、50 μ g/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで一夜培養し、15 菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドについて塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNAsequencer (ABI 社) にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをC λ /pUC19とした。

20 (iii) ヒトL鎖 κ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

プラスミドHEF-PM1k-gk (W092/19759) からL鎖 κ 鎖C領域をコードするDNA断片をPCR法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA synthesizer (ABI 社) を用いて合成した前方プライマーHKAPS (配列番号19) はEcoRI 、Hind III、Bln I認識配列を、後方プライマーHKAPA (配列番号20) はEcoRI 認識配列を有する25 ように設計した。

鋳型となるプラスミドHEF-PM1k-gk 0.1 μ g、プライマーHKAPS 、HKAPA 各5 0pmole 、5 UのTaKaRaEx Taq (宝酒造) を含有する100 μ l の反応混合液を用い、50 μ l の鉱油を上層した。94°Cにて1分間、60°Cにて1分間、72°Cにて1分間の反応を30サイクル行った。360bp のPCR産物を3 %低融点アガロースゲル

で電気泳動した後、GENECLEAN II Kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。

得られたDNA断片をEcoRI で消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19 Δ Hind IIIにクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換
5 し、50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドの塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNA sequencer (ABI社) にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをCκ/pUC19とした。

10 (3) キメラ抗体L鎖発現ベクターの構築

キメラ#23-57-137-1抗体L鎖発現ベクターを構築した。プラスミドCλ/pUC19、Cκ/pUC19 のヒト抗体定常領域の直前にあるHind III、BlnI部位に、#23-57-137-1L鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、それぞれキメラ#23-57-137-1抗体L鎖V領域およびL鎖κ鎖またはL鎖κ鎖定常領域をコードするpUC19 ベクターを作製した。EcoRI 消化によってキメラ抗体L鎖遺伝子を切り出し、HEF発現ベクターへサブクローニングを行った。

すなわち、プラスミドMBC1L24 から#23-57-137-1抗体L鎖V領域をPCR法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer (ABI社) を用いて行った。後方プライマーMBCCHL1 (配列番号21) はHind III認識配列とKozak 配列 (Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) を、前方プライマーMBCCHL3 (配列番号22) はBglII、EcoRI 認識配列を有するように設計した。

PCRは、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KC1、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.1 μg のMBC1L24、プライマーとしてMBCCHL1 およびMBCCHL3 を各50pmole、
25 1 μl のAmpliTaq (PERKIN ELMER) を含有する100 μl の反応混合液を用い、50 μl の鉢油を上層して94°Cにて45秒間、60°Cにて45秒間、72°Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。

444bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN I kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1 mM

EDTA 溶液 $20\mu l$ に溶解した。PCR産物 $1\mu l$ をそれぞれ $10mM$ Tris-HCl (pH7.5)、 $10mM$ MgCl₂、 $1mM$ DTT、 $50mM$ NaCl、 $8U$ のHind III (宝酒造) および $8U$ のEcoRI (宝酒造) を含有する反応混合液 $20\mu l$ 中で $37^{\circ}C$ にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿5で回収し、 $10mM$ Tris-HCl (pH7.4)、 $1mM$ EDTA 溶液 $8\mu l$ に溶解した。

プラスミドpUC19 $1\mu g$ を同様にHind IIIおよびEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ (E. coli C75, 宝酒造) でBAP処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、 $10mM$ Tris-HCl (pH7.4)、 $1mM$ EDTA 溶液 $10\mu l$ に溶解した。

BAP処理したプラスミドpUC19 $1\mu l$ と先のPCR産物 $4\mu l$ をDNA Ligation Kit Ver. 2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) に前述と同様に形質転換した。これを $50\mu g/ml$ アンピシリンを含有する $2\times$ YT寒天培地にまき、 $37^{\circ}C$ で一夜培養した。得られた形質転換体を、 $50\mu g/ml$ 15アンピシリンを含有する $2\times$ YT培地 $2ml$ で $37^{\circ}C$ で一夜培養した。菌体画分からQIA prep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドをCHL/pUC19 とした。

プラスミドC λ /pUC19、C κ /pUC19 各 $1\mu g$ をそれぞれ $20mM$ Tris-HCl (pH8.5)、 $10mM$ MgCl₂、 $1mM$ DTT、 $100mM$ KCl、 $8U$ の Hind III (宝酒造) および20 U のBlnI (宝酒造) を含有する反応混合液 $20\mu l$ 中で $37^{\circ}C$ にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、 $37^{\circ}C$ で30分間BAP処理を行った。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収し、 $10mM$ Tris-HCl (pH7.4)、 $1mM$ EDTA 溶液 $10\mu l$ に溶解した。

25 #23-57-137-1L鎖V領域を含むプラスミドCHL/pUC19 から $8\mu g$ を同様にHind IIIおよびBlnIで消化した。得られた409bp のDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、 $10mM$ Tris-HCl (pH7.4)、 $1mM$ EDTA 溶液 $10\mu l$ に溶解した。

このL鎖V領域DNA $4\mu l$ をBAP処理したプラスミドC λ /pUC19 または

C_κ / pUC19 各 1 μl にサブクローニングし、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μg/ml アンピシリンを含有する 2×YT 培地 3 ml で一夜培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミド MBC1L(λ)/pUC19、MBC1L(κ)/pUC19 とした。

プラスミド MBC1L(λ)/pUC19 および MBC1L(κ)/pUC19 をそれぞれ EcoRI で消化し、3 % 低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bp の DNA 断片を GENECL EANII Kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA 溶液 10 μl に溶解した。

発現ベクターとしてプラスミド HEF-PM1k-gk 2.7 μg を EcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNA をエタノール沈殿で回収した。回収した DNA 断片を BAP 处理した後、1 % 低融点アガロースゲルで電気泳動し、6561bp の DNA 断片を GENE CLEAN II Kit (BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA 溶液 10 μl に溶解した。

BAP 处理した HEF ベクター 2 μl を上記プラスミド MBC1L(λ) または MBC1L(κ) EcoRI 断片各 3 μl と連結し、大腸菌 JM109 コンピテント細胞に形質転換した。50 μg/ml アンピシリンを含有する 2×YT 培地 2 ml で培養し、菌体画分から QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、20 mM Tris-HCl (pH 8.5)、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、100 mM KCl、8 U の HindIII (宝酒造) および 2 U の PvuI (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μl 中で 37°C にて 1 時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば 5104/2195 bp、逆方向に挿入されていれば 4378/2926 bp の消化断片が生じることより、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれ MBC1L(λ)/neo、MBC1L(κ)/neo とした。

25 (4) COS-7 細胞のトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドを COS-7 紡錘で一過性に発現させた。

すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミド MBC1HcDNA/pCOS1 と MBC1L(λ)/neo または MBC1HcDNA/pCOS1 と MBC1L(κ)/neo の組み合わせで、Gene Pulser 装置

(Bio Rad) を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS (-) 中に1x10⁷ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10μgを加え、1,500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2% 5 のUltra Low IgGウシ胎児血清 (GIBCO) を含有するDMEM培地 (GIBCO) に懸濁し、10 cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

また、COS-7細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MAPSIIキット (BioRad) を用いてキット添付の処方に従って行った。

10 (5) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート (Maxisorp, NUNC) の各穴を固相化バッファー (0.1M NaHCO₃, 0.02% NaN₃) で1μg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100μlで固相化し、200 15 μlの希釈バッファー (50mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂ , 0.1M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% NaN₃, 1% 牛血清アルブミン (BSA), pH7.2) でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフェオスマーカー結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO) 100μlを加えた。1時間室温 20 にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液 (Sigma104, p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA) を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1と Purified (The Binding Site) を用いた。

(ii) 抗原結合能の測定

25 抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1 μg/mlの濃度に調製したヒトPTHrP (1-34) (ペプチド研究所) 100μlで固相化した。200μlの希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で

洗浄後、アルカリリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100μlを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

5 その結果、キメラ抗体は、ヒトPTHRP(1-34)に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された。また、キメラ抗体においてL鎖C領域が α 鎖あるいは β 鎖のいずれであっても抗体のPTHRP(1-34)に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖 α 鎖を用いて構築した。

10 (6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドMBC1H cDNA/pCH01とMBC1L(λ)/neoまたはMBC1HcDNA/pCH01とMBC1L(κ)/neoの組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収してエレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に1x10⁷ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10μgを加え、1,500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)を添加したMEM-α培地(GIBCO)に懸濁し、3枚の96穴プレート(Falcon)を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN(G418Sulfate、GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM-α培地(GIBCO)の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のU1

tra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2μmのフィルター(Millipore)により細胞破片を除去した。

CHO細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROSプロテインAカラム(PerSeptive Biosystems)を用いて、ConSep LC100(Millipore)にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

[参考例4] ヒト型化抗体の構築

10 (1) ヒト型化抗体H鎖の構築

(i) ヒト型化H鎖V領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体S31679(NBRI-PDB、Cuisinier A. M. ら、Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993)由来のFRを有するヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖(バージョン"15 a")の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1(配列番号23)及びMBC1HGP3(配列番号24)はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1HGP2(配列番号25)及びMBC1HGP4(配列番号26)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1HVS1(配列番号27)及びMBC1HVR1(配列番号28)はCDRグラフティングプライマーMBC1HGP1及びMBC1HGP4とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、25 ゲルからの抽出はcrush and soak法(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20μlの1

0 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM EDTA溶液に溶解した。PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、100 μ l の反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4をそれぞれ1 μ l、0.25 mMのdNTP、2.5 UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付緩衝液を使用して94°Cにて1分間、55°Cにて1分間、72°Cにて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに50 pmoleの外部プライマーMBC1HVS1及びMBC1HVR1を加え、同じ温度サイクルを30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を4% Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BI0101) を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhMBCHv/pUC19と命名した。

15 (ii) ヒト型化H鎖cDNAのためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したヒト型化H鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1HVS2はV領域のリーダー配列の5'-側をコードする配列とハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列 (Kozak, M. ら、J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)、HindIIIおよびEcoRI認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つC領域の5'-側の配列をコードしApalおよびSmaI認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、鋳型DNAとして0.4 μ gのhMBCHv/pUC19を用い、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50 pmole、2.5 UのTaKaRa Ex Taq、0.25 mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用し、94°Cにて1分間、55°Cにて1分間、72°Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3% Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

456 bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit (BI0101)

1)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液20μlに溶解した。得られたPCR反応混合物をEcoRIおよびSmaIで消化することで調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にEcoRIおよびHindIII認識配列及びKozak配列、3'-側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをhMBC1Hv/pUC19と命名した。

(2) ヒト型化抗体H鎖の発現ベクターの構築

hPM1抗体H鎖 cDNAの配列を含むプラスミドRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIにて消化し、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したhMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをhMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはヒト型化#23-57-137-1抗体のH鎖V領域及びヒトH鎖C領域C γ 1を含み、5'-末端にEcoRIおよびHindIII認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19に含まれるヒト型化H鎖バージョン”a”の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号58に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号56に示す。

hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCH01に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCH01と命名した。

25 (3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築

(i) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体の作製

ヒト型化抗体とマウス（キメラ）抗体のFR領域を組み換えたL鎖遺伝子を構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflII切断部位を利用することによって、FR1及び2はヒト抗体由来、FR3及び4はマウス

抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L(λ)/neo及びhMBC1L(λ)/neo各10μgを10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01% (w/v) BSA, AflII (宝酒造) 10Uを含有する反応混合液100μl中で37℃にて1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(c1とする)および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(h1とする)および1022bpの断片(h2とする)を、GENECLEANII Kit (BI0101)を用いてゲルから回収、精製した。

回収したc1, h1断片各1μgについてBAP処理を行った。DNAをフェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液10μlに溶解した。

BAP処理したc1及びh1断片1μlをそれぞれh2, c2断片4μlに連結し(4℃、一夜)、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, ApaI (宝酒造) 2U、またはBamHI (宝酒造) 8U, HindIII (宝酒造) 8Uを含有する反応混合液20μl中で37℃、1時間消化した。c1-h2が正しく連結されていれば、ApaIで5560/1246/498bp、BamHI/HindIIIで7134/269bpの消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。

これをヒトFR1, 2/マウスFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをh/mMBC1L(λ)/neoとした。一方、h1-c2のクローンが得られなかつたので、pUCベクター上で組換えてからHEFベクターにクローニングした。その際、アミノ酸置換のないヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Laλ/pUC19、及びFR3内の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに置換したヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Ldλ/pUC19を鋳型として用いた。

プラスミドMBC1L(λ)/pUC19、hMBC1Laλ/pUC19及びhMBC1Ldλ/pUC19の各10μgを10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01% (w/v) BSA,

HindIII 16U, AfI III 4Uを含有する反応混合液30μl中で37℃、1時間消化した。反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/pUC19から215bp(c2')、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19およびhMBC1Ldλ/pUC19からそれぞれ3218bp(ha1', hd1')のDNA断片をGENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回5 収、精製した。

ha1'、hd1'断片をそれぞれc2'断片に連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドm/hMBC1Laλ/pUC19、m/hMBC1Ldλ/pUC19とした。

10 得られたプラスミドm/hMBC1Laλ/pUC19、m/hMBC1Ldλ/pUC19をEcoRIで消化した。それぞれ743bpのDNA断片を2%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液20μlに溶解した。

各DNA断片4μlを前述のBAP処理したHEFベクター1μlに連結し、大腸菌JM10915 コンピテント細胞に形質転換した。50μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1020 0mM KCl, HindIII(宝酒造)8U, PvuI(宝酒造)2Uを含有する反応混合液20μl中で37℃にて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれマウスFR1, 2／ヒトFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hMBC1Laλ/neo、m/hMBC1Ldλ/neoとした。

(ii) FR 1／FR 2ハイブリッド抗体の作製

25 CDR1内にあるSnaBI切断部位を利用することによって、同様にFR1とFR2のハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L(λ)/neo及びh/mMBC1L(λ)/neoの各10μgを10mM Tris-HCl(pH7.9), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v) BSA, SnaBI(宝酒造)6Uを含有する反応混合液20μl中で37℃にて1時間消化した。次に20mM Tris-HCl

(pH8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.01% (w/v) BSA, PvuI 6 Uを含有する反応混合液50μl中で37℃にて1時間消化した。

反応液を1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミドMBC1L(λ)/neoから4955bp(m1)および2349bp(m2)、プラスミドh/mMBC1L(λ)/neoから4955bp(hm1)および2349bp(hm2)の各DNA断片をGENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液40μlに溶解した。

m1, hm1断片1μlをそれぞれhm2, m2断片4μlに連結し、大腸菌JM109コンピメント細胞に形質転換した。50μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精10 製した。

精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, ApaI(宝酒造)8U、またはApaLI(宝酒造)2Uを含有する反応混合液20μl中で37℃にて1時間消化した。

各断片が正しく連結されていれば、ApaIで7304bp、ApaLIで5560/1246/498bp(m1-hm2)、ApaIで6538/766bp、ApaLIで3535/2025/1246/498bp(hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれヒトFR1/マウスFR2, 3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをhmMBC1L(λ)/neo、マウスFR1/ヒトFR2/マウスFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをmhMBC1L(λ)/neoとした。

20 (4) ヒト型化抗体L鎖の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体HSU03868(GEN-BANK、Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994)由来のFR1、FR2およびFR3、並びにヒト抗体S25755(NBPF-PDB)由来のFR4を有するヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖(バージョン" a")の作製のため25 に6個のPCRプライマーを使用した。

CDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1(配列番号29)及びMBC1LGP3(配列番号30)はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1LGP2(配列番号31)及びMBC1LGP4(配列番号32)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1LV

S1(配列番号33)及びMBC1LVR1(配列番号34)はCDRグラフティングプライマーMBC1LGPI及びMBC1LGP4とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーMBC1LGPI、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20μlの10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA溶液に溶解した。

PCRは、TaKaRa Ex Taq(宝酒造)を用い、100μlの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフティングプライマーMBC1LGPI、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4をそれぞれ1μl、0.25mMのdNTP、2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付緩衝液を使用して94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行い、この反応混合液に50pmoleの外部プライマーMBC1LVS1及びMBC1LVR1を加え、さらに同じ温度サイクルで30回反応させた。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドをhMBCL/pUC19と命名した。しかしながらCDR4の104位(Kabatの規定によるアミノ酸番号96位)のアミノ酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正するための修正プライマーMBC1LGP10R(配列番号35)を設計し、合成した。PCRはTaKaRa Taq(宝酒造)を用い、100μlの反応混合液に錆型DNAとして0.6μgのプラスミドhMBCL/pUC19、プライマーとしてMBC1LVS1及びMBC1LGP10Rをそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq(宝酒造)0.25mMのdNTPを含む条件で添付の緩衝液を使用して50μlの鉱油を上

層して94°Cにて1分間、55°Cにて1分間、72°Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

M13 Primer M4プライマー及びM13 Primer RVプライマーを用いて塩基配列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドをHindIIIおよびBlnIで消化し、416bpの断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離した。GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をHindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドC λ /pUC19に導入し、プラスミドhMBC1La λ /pUC19と命名した。このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1La λ /pCOS1と命名した。ヒト型化L鎖バージョン" a "の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)を配列番号66に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号47に示す。

バージョン" b "をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン" b "では43位(Kabatの規定によるアミノ酸番号43位)のグリシンをプロリンに、49位(Kabatの規定によるアミノ酸番号49位)のリジンをアスパラギン酸に変更するよう設計した。変異原プライマーMBC1LGP5R(配列番号36)とプライマーMBC1LVS1によりプラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、pUC19のBamHI, HindIII部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素HindIIIおよびAflIIIで消化し、HindIIIおよびAflIIで消化したhMBC1La λ /pUC19と連結した。

こうして得られたプラスミドをhMBC1Lb λ /pUC19とし、このプラスミドをEcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAを含む断片をプラスミドpCOS1に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。

こうして得られたプラスミドをhMBC1Lb λ /pCOS1と命名した。

バージョン“c”をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン“c”では84位(Kabatの規定によるアミノ酸番号80位)のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP6S(配列番号37)とプライマーM13 Prim 5 er RVによりプラスミドhMBC1La λ /pUC19を鑄型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HIで消化したhMBC1La λ /pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc λ /pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc λ /pCOS1と命名した。

バージョン“d”、“e”及び“f”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に“a”、“b”、“c”バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP11R(配列番号38)とプライマーM-S1(配列番号44)によりそれぞれhMBC1La λ /pCOS1、hMBC1Lb λ /pCOS1、hMBC1Lc λ /pCOS1を鑄型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIII 20で消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。塩基配列決定後、HindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したC λ /pUC19と連結した。

こうして得られたプラスミドを順にhMBC1Ld λ /pUC19、hMBC1Le λ /pUC19、hMBC1Lf λ /pUC19とした。これらのプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Ld λ /pCOS1、hMBC1Le λ /pCOS1、hMBC1Lf λ /pCOS1と命名した。

バージョン“g”及び“h”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バ-

ジョンとも順に" a "、" d " バージョンの36位 (Kabatの規定によるアミノ酸番号16位) のヒスチジンをチロシンに変更するように設計した。変異原プライマー MBC1LGP9R (配列番号39) およびM13 Primer RVをプライマーとして用いて、hMBC1La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物とM13 Primer M4をプライマーとして用いて、プラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてさらにPCRを行った。得られたDNA断片をHindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することで調製したプラスミドC λ /pUC19にサブクローニングした。このプラスミドを鋳型として、プライマーMBC1LGP13R (配列番号40) とMBC1LVS1をプライマーとしたPCRを行った。得られたPCR断片をApaIおよびHindIIで消化し、ApaIおよびHindIIIで消化したプラスミドhMBC1La λ /pUC19およびhMBC1Ld λ /pUC19に導入した。塩基配列を決定し、正しい配列を含むプラスミドを順にhMBC1Lg λ /pUC19およびhMBC1Lh λ /pUC19とし、これらのプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Lg λ /pCOS1およびhMBC1Lh λ /pCOS1と命名した。

バージョン" i "、" j "、" k "、" l "、" m "、" n " および" o " をPCR法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S (配列番号41) とプライマー-V1RV (λ) (配列番号43) によりプラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をApaIおよびBlnIで消化し、ApaIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドhMBC1Lg λ /pUC19にサブクローニングした。塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lx λ /pUC19 ($x = i, j, k, l, m, n, o$) とし、このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lx λ /pCOS1 ($x = i, j, k, l, m, n, o$) と命名した。バージョン" j "、" l "、" m " および" o " の塩基配列 (対応するアミノ酸を含む) をそれぞれ配列番号67、68、69、70に示す。また、これらの各バージョン

のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号48、49、50、51に示す。

バージョン"p"、"q"、"r"、"s"および"t"は、バージョン"i"、"j"、"m"、"l"または"o"のアミノ酸配列の87位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3内にある制限酵素Aor51MI切断部位を利用して、バージョン"h"を、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l"または"o"とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミトhMBC1Lxλ/pCOS1 (x = i, j, m, l, o) 中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpを除き、ここに発現プラスミドhMBC1Lhλ/pCOS1中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpをつなぐことにより91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンとなるようにした。塩基配列決定を行い、各バージョン"i"、"j"、"m"、"l"および"o"の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンがイソロイシンに置換されたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ"p"、"q"、"s"、"r"および"t"とし、得られたプラスミドをhMBC1Lxλ/pCOS1 (x = p, q, s, r, t)と命名した。バージョン"q"、"r"、"s"および"t"の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号71、72、73、74に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号52、53、54、55に示す。

プラスミドhMBC1Lqλ/pCOS1をHindIIIおよびEcoRIで消化し、HindIIIおよびEcoRIで消化したプラスミドpUC19にサブクローニングし、プラスミドhMBC1Lqλ/pUC19と命名した。

ヒト型化L鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表2に示す。

表 2

バージョン	3 6	4 3	4 5	4 7	4 9	8 0	8 7
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラギン酸、Iはイソロイシンを示す。

5 なお、前記プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19およびhMBC1Lq λ /pUC19を有する大腸菌はEscherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) および Escherichia coli JM109 (hMBC1Lq λ /pUC19) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、Escherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) についてはFERM BP-5629、Escherichia coli JM109 (hMBC1Lq λ /pUC19) についてはFERM BP-5630としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5) COS-7細胞へのトランスフェクション

ハイブリッド抗体およびヒト型化#23-57-137-1抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

15 すなわちL鎖ハイブリッド抗体の一過性発現では、プラスミド h MBC1HcDNA/pCOS1とh/mMBC1L (λ) /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1La λ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1Ld λ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とhmmMBC1L (λ) /neo、またはhMBC1HcDNA/

pCOS1とmhmMBC1L(λ)/neoとの組み合わせを、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に1×10⁵細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10μgを加え、1.500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

ヒト型化#23-57-137-1抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とhmBC1Lxλ/pCOS1(x=a~t)のいずれかの組み合わせをGene Pulser装置(BioRad)を用いて、前記ハイブリッド抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランسفエクションし、得られた培養上清をELISAに供した。

また、COS-7細胞の培養上清からのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精製は、AffiGel ProteinA MAPSIIキット(BioRad)を用いて、キット添付の処方に従って行った。

(6) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO₃, 0.02% NaN₃)で1μg/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100μlで固相化し、200μlの希釈バッファー(50mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂, 0.1M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% NaN₃, 1%牛血清アルブミン(BSA), pH7.2)でブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100μlを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104, p-ニトロフェニルリノ酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスタンダードとして、Hu IgG1λ Purified(The Bi

nding Site) を用いた。

(ii) 抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製したヒトPThrP(1-34) $100 \mu\text{l}$ で固相化した。 $200 \mu\text{l}$ の希釈バッファーでブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO) $100 \mu\text{l}$ を加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、 $1 \text{mg}/\text{ml}$ の基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

(7) 活性確認

(i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン" a "とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPThrP結合能が同等であった。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバージョン" a "で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン" a "をヒト型化抗体のH鎖として供した。

(ii) ハイブリッド抗体の活性

(ii-a) FR1, 2/FR3, 4ハイブリッド抗体

L鎖がh/mMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかつたが、m/hMBC1La λ あるいはm/hMBC1Ld λ の場合はいずれもキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR3, 4はヒト型化抗体として問題ないが、FR1, 2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(ii-b) FR1/FR2ハイブリッド抗体

L鎖がmhmMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかつたが、hmhmMBC1L(λ)の場合はキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR1, 2のうちFR1はヒト型化抗体として問題ないが、FR2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(iii) ヒト型化抗体の活性

L鎖としてバージョン" a " から " t " の各々一つを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン" j "、" l "、" m "、" o "、" q "、" r "、" s "、" t " を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のPTHRP結合能を示した。

5 (8) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドhMBC1HcDNA/pCH01とhMBC1Lmλ/pCOS1またはhMBC1HcDNA/pCH01とhMBC1Lqλ/pCOS1あるいはhMBC1HcDNA/pCH01とhMBC1Lrλ/pCOS1の組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に1x10⁷ 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞15 0.8mlに、各プラスミドDNA 10μgを加え、1,500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)添加、MEM-α培地(GIBCO)に懸濁し、96穴プレート(Falcon)を用いてCO₂インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) 添加、20 リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM-α培地(GIBCO)の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のU1 tra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM-α培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2μmのフィルター(Millipore)により細胞破片を除去した。CHO細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROSプロテインAカラム(PerSeptive Biosystems)を用いて、ConSep LC100(Millipore)にて添付の処方に

従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

〔参考例5〕 中和活性の測定

5 マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉腫細胞株ROS17/2.8-5細胞を用いて行った。すなわち、ROS17/2.8-5細胞を、10%牛胎児血清(GIBCO)を含むHam's F-12培地(GIBCO)中にて、CO₂インキュベーターで培養した。ROS17/2.8-5細胞を96穴プレートに104 細胞／100 μl／穴で蒔込み1日間培養し、4mMのHydrocortisoneと10%牛胎児血清を含むHam's F-12培地
10 (GIBCO)に交換する。さらに3ないし4日間培養した後、260 μlのHam's F-12培地(GIBCO)にて洗浄し、1 mMのイソブチル-1-メチルキサンチン(IBMX、SIGMA)および10%の牛胎児血清と10mMのHEPESを含む80 μlのHam's F-12を加え、30分間37°Cでインキュベートした。

中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ10 μg/ml、3.3 μg/ml、1.1 μg/mlおよび0.37 μg/mlの群、10 μg/ml、2 μg/ml、0.5 μg/mlおよび0.01 μg/mlの群、または10 μg/ml、5 μg/ml、1.25 μg/ml、0.63 μg/mlおよび0.31 μg/mlの群に段階希釈し、4ng/mlに調製したPTHrP(1-34)と等量混合し、各抗体とPTHrP(1-34)の混合液80 μlを各穴に添加した。各抗体の最終濃度は上記抗体濃度の4分の1になり、PTHrP(1-34)の濃度は1 ng/mlになる。
15 20 分室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBSにて3回洗浄した後、100 μlの0.3%塩酸95%エタノールにて細胞内のcAMPを抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)付属のEIAバッファー120 μlを添加しcAMPを抽出後、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)添付の処方に従ってcAMPを測定した。その結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有するL鎖バージョンのうち、91位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン"q"、"r"、"s"、"t"を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン"q"がもっとも強い中和能を示した。

配列表フリーテキスト

配列番号1：合成DNA
配列番号2：合成DNA
配列番号3：合成DNA
配列番号4：合成DNA
5 配列番号5：合成DNA
配列番号6：合成DNA
配列番号7：合成DNA
配列番号8：合成DNA
配列番号9：合成DNA
10 配列番号10：合成DNA
配列番号11：合成DNA
配列番号12：合成DNA
配列番号13：合成DNA
配列番号14：合成DNA
15 配列番号15：合成DNA
配列番号16：合成DNA
配列番号17：合成DNA
配列番号18：合成DNA
配列番号19：合成DNA
20 配列番号20：合成DNA
配列番号21：合成DNA
配列番号22：合成DNA
配列番号23：合成DNA
配列番号24：合成DNA
25 配列番号25：合成DNA
配列番号26：合成DNA
配列番号27：合成DNA
配列番号28：合成DNA
配列番号29：合成DNA

配列番号30：合成DNA

配列番号31：合成DNA

配列番号32：合成DNA

配列番号33：合成DNA

5 配列番号34：合成DNA

配列番号35：合成DNA

配列番号36：合成DNA

配列番号37：合成DNA

配列番号38：合成DNA

10 配列番号39：合成DNA

配列番号40：合成DNA

配列番号41：合成DNA

配列番号42：合成DNA

配列番号43：合成DNA

15 配列番号44：合成DNA

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

20 産業上の利用の可能性

本発明により、PTH受容体又はPTH_rP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTH_rPに起因する疾患の治療剤が提供される。

請求の範囲

1. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHrPに起因する疾患の治療剤。
2. 疾患が、主として高カルシウム血症以外の、PTHまたはPTHrPに起因する疾患である請求項1記載の治療剤。
3. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHrPに起因する疾患による症状を緩和するためのQOL改善剤。
4. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHrPに起因する悪性腫瘍随伴性症候群の治療剤。
5. 悪性腫瘍性随伴性症候群が、消化器障害、蛋白代謝異常、糖代謝異常、脂質代謝異常、食思不振、血液学的異常、電解質異常、免疫不全、及び疼痛からなる群より選択される請求項4記載の治療剤。
6. 疾患が、PTHに起因する二次性副甲状腺機能亢進症または原発性副甲状腺機能亢進症である請求項1または2記載の治療剤。
7. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHrPに起因する中枢神経系疾患の改善剤。
8. 中枢神経系疾患が、睡眠障害、神経障害、神経症状、脳代謝異常、脳循環異常、自律神経失調症、及び中枢神経系が関与する内分泌系の異常からなる群より選択される請求項7記載の改善剤。
9. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物

質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHrP—サイトカインカスケードに起因する疾患の改善剤。

10. サイトカインが、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL
5 -9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、EPO、LIF、T
PO、EGF、TGF- α 、TGF- β 、FGF、IGF、HGF、VEGF、NGF、アクチビン、インヒビ
ン、BMPファミリー、TNF、及びIFNからなる群より選択される請求項9記載の改
善剤。

11. PTHまたはPTHrP—サイトカインカスケードに起因する疾患が、敗血症、悪
10 液質、炎症、血液疾患、カルシウム代謝異常、及び自己免疫疾患からなる群より
選択される請求項9または10記載の改善剤。

12. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用
物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を
促進又は阻害する物質を有効成分として含む、中枢神経系調節剤。

15 13. PTH受容体又はPTHrP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用
物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を
促進又は阻害する物質を有効成分として含む、サイトカインネットワーク調節剤。

14. PTH受容体又はPTHrP受容体が、PTH/PTHrPタイプI受容体である請求項1
～13のいずれかに記載の薬剤。

20 15. PTH受容体又はPTHrP受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合
を阻害する物質が、抗PTHrP抗体および抗PTH抗体からなる群より選択される請求
項1～14のいずれかに記載の薬剤。

16. PTH受容体又はPTHrP受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合
を阻害する物質が、抗PTHrP抗体である請求項15記載の薬剤。

25 17. 抗PTHrP抗体が、ヒト型化抗PTHrP抗体である請求項16記載の薬剤。

図 1

**高PTHrP血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の
血中バソプレシン濃度に与える影響**

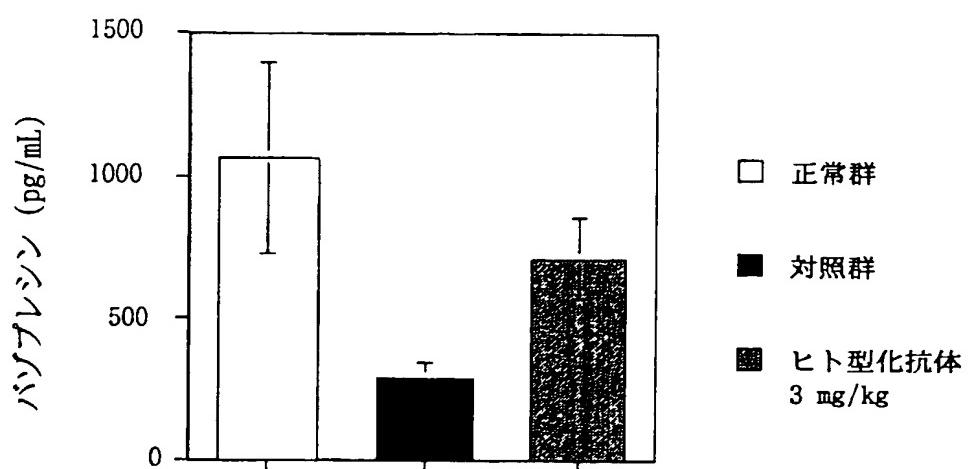


図 2

**高PTHrP血症モデルラットにおけるヒト型化抗PTHrP抗体の
尿量に与える影響**

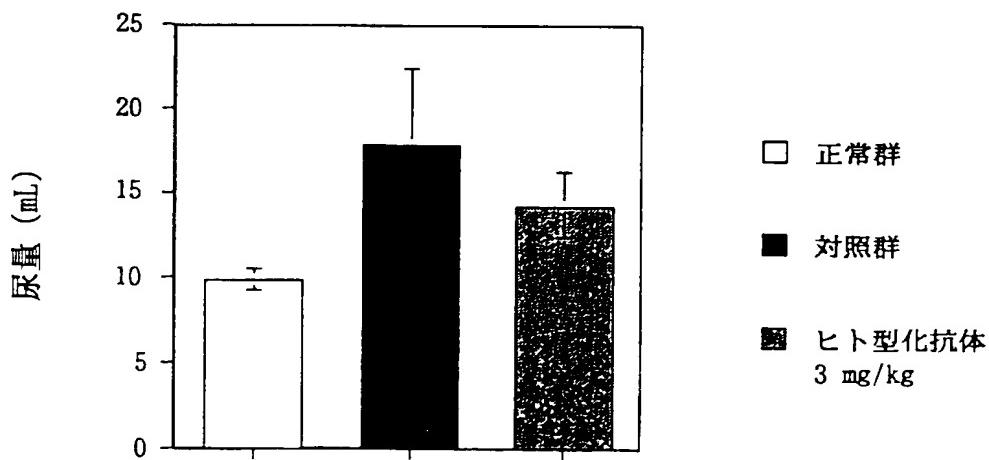




図 3

ヒト型化抗 PTHrP 抗体の敗血症モデルでの薬効

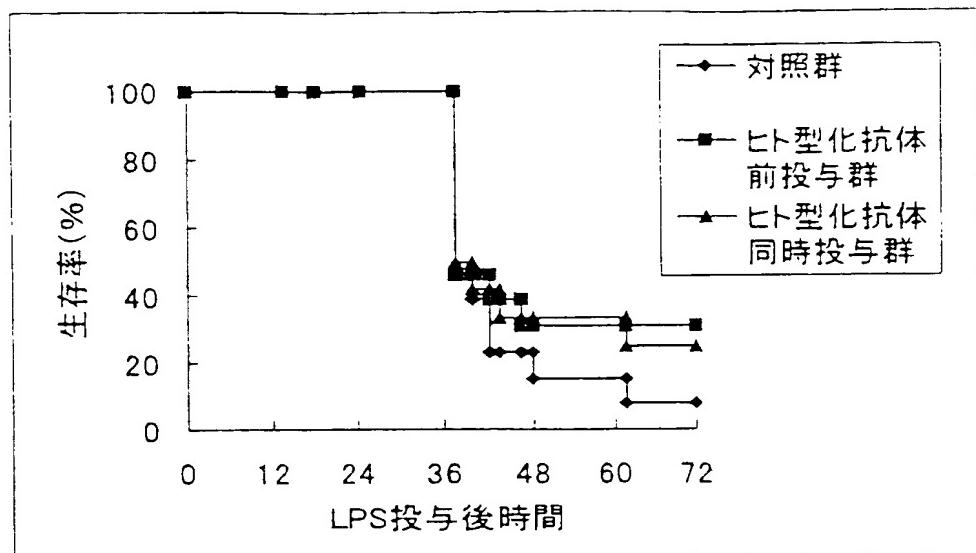




図 4

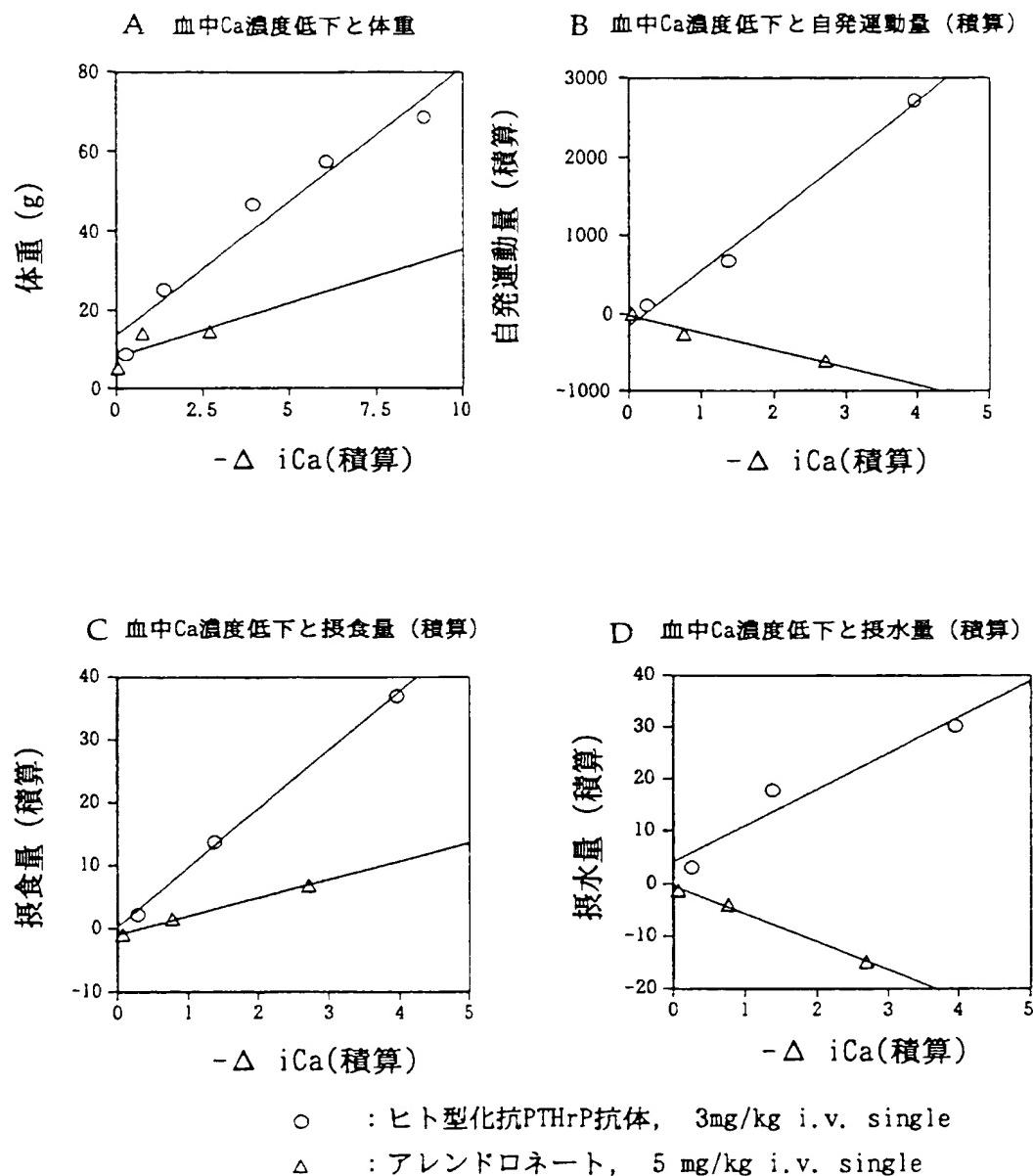
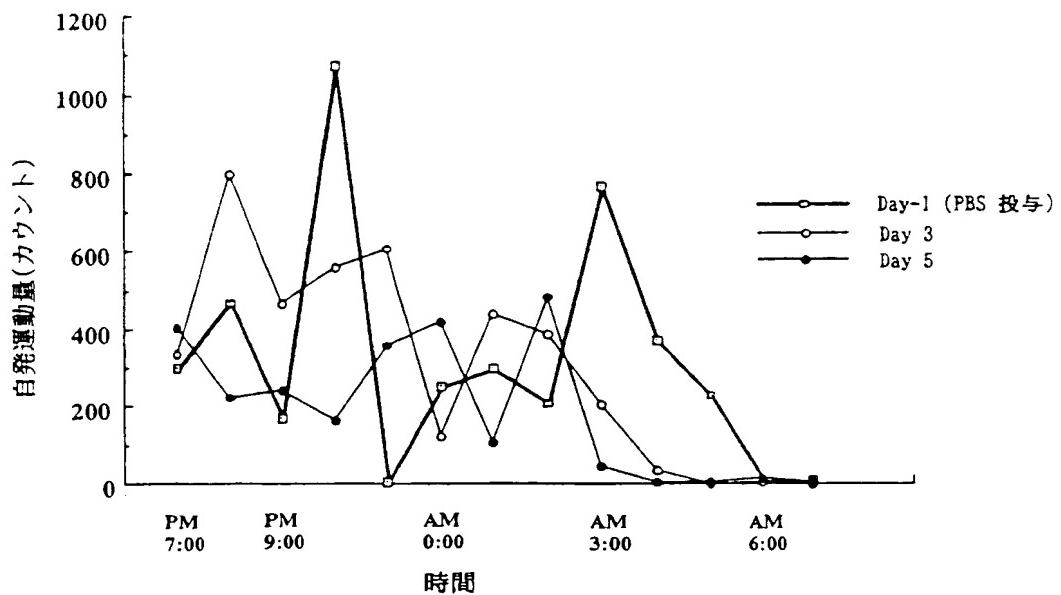


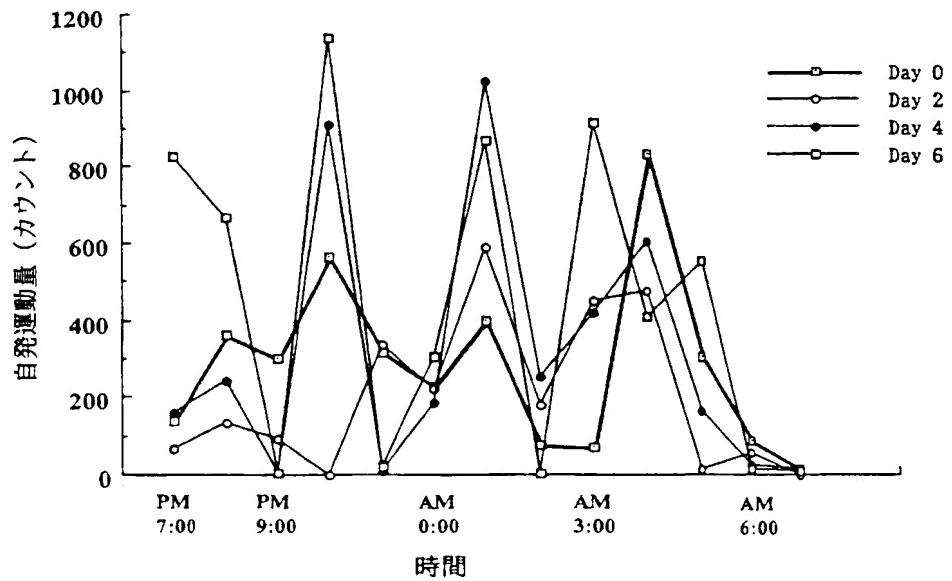


図 5

A 自発運動量 (HFM control)



B 自発運動量 (ヒト型化抗PTHRP抗体、5mg/kg i.v.)





SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Therapeutic agent for diseases caused with PTH or PTHrP

<130> PH-945-PCT

<150> JP 11-189793

<151> 1999-07-02

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

aaatagccct tgaccaggca 20

<210> 2

<211> 38

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

cgtttcggc ccacctctga aggttccaga atcgatag 38

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

ggatccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ggatccggg tcagrggaag gtggaaaca 29



<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gttttcccg tcacgac

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

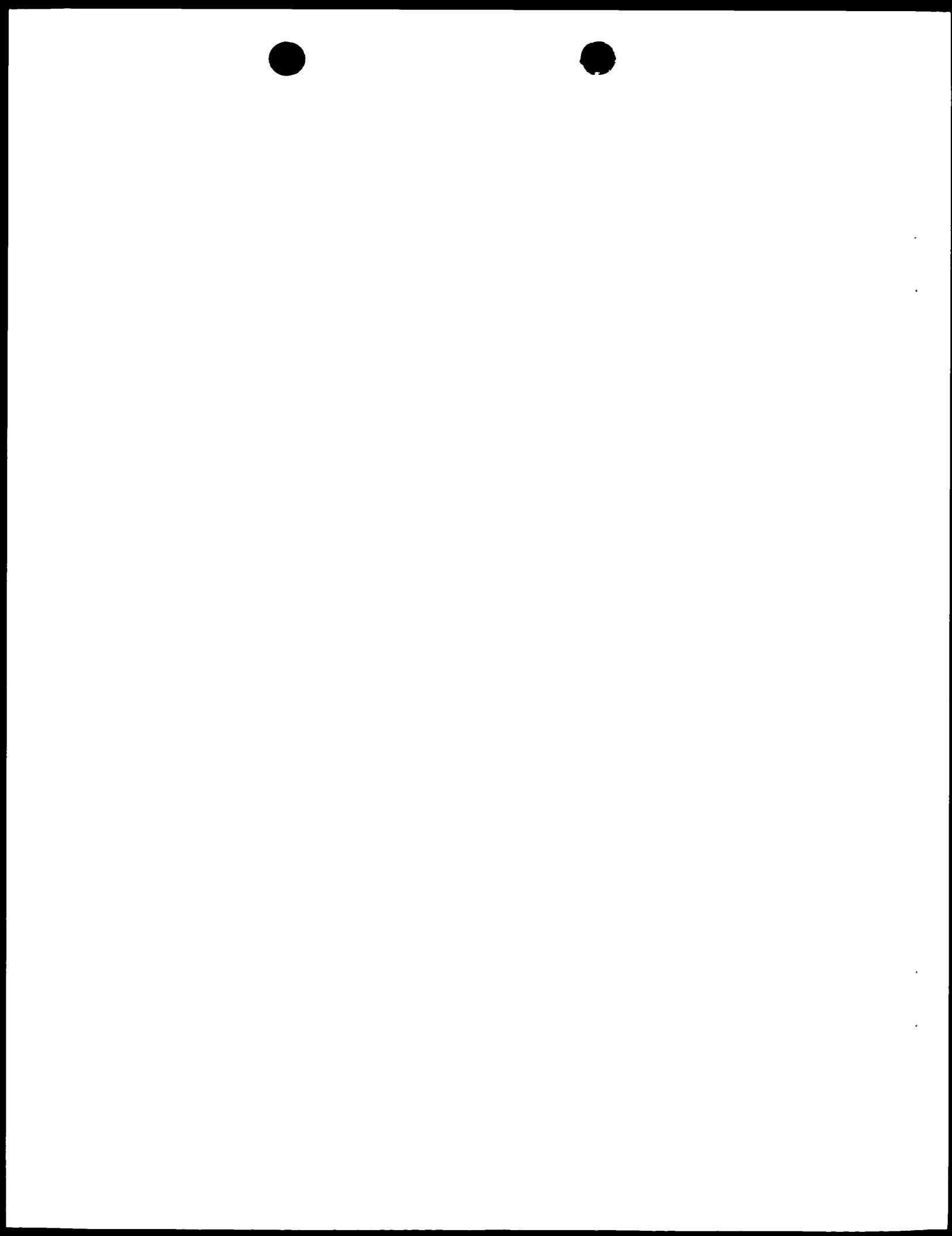
<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Synthetic DNA

<400> 7

gtctaaagctt ccaccatgaa acttcgggct c

31

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

tgttgatcc ctgcagagac agtgaccaga

30

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

gtctgaattc aagcttccac catgggttt gggctg

36

<210> 10

<211> 41



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

t t c c c g g g c c c t g g t g g a g g c t g a g g a g a c g g t g a c c a g a

41

<210> 11

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

g t c t g a a t t c a a g c t t a g t a c t t g g c c a g c c a a g g c c a a

60

c g c c c t c t c t g a g g a g c t c c a a g c c a a c a a g g c c a a c a c t

109

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 12
ggtttgggg ttcctactcc cgccttgcacg gggctgtccat ctgccttcca ggcactgtc 60
acagctccccg ggttagaagtc actgtatcaga cacactatgt tgcccttgtt 110

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13
ggagttggaga ccaccaaacc ctccaaacag agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 60
ctgaggctga cgccc gagca gtggaaatcc cacagaag 98

<210> 14

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14
tgttgaatic ttactatgaa cattctgttag gggccactgt ctctccacg gtgtccctt 60
catgcgtgac ctggcagctgt tagcttctgt gggacttcca ctgttc 106

<210> 15



<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa ccc

43

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

tgttgaattc ttactatgaa

20

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 17

caacaaggtaac gggcccgagca gtttacctttag ccttgacgccc 39

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

gtatgtgctg gccgcgtact ttttttttttcttggaa 39

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

gtctgaattt aagcttagtc ctaggtcgaa ctgtggctgc accatc 46

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

tgttgaattt tactaacac tccccctgt tgaa 34

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

gtctaagttt ccaccatggc ctggactctt ctctt 35

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

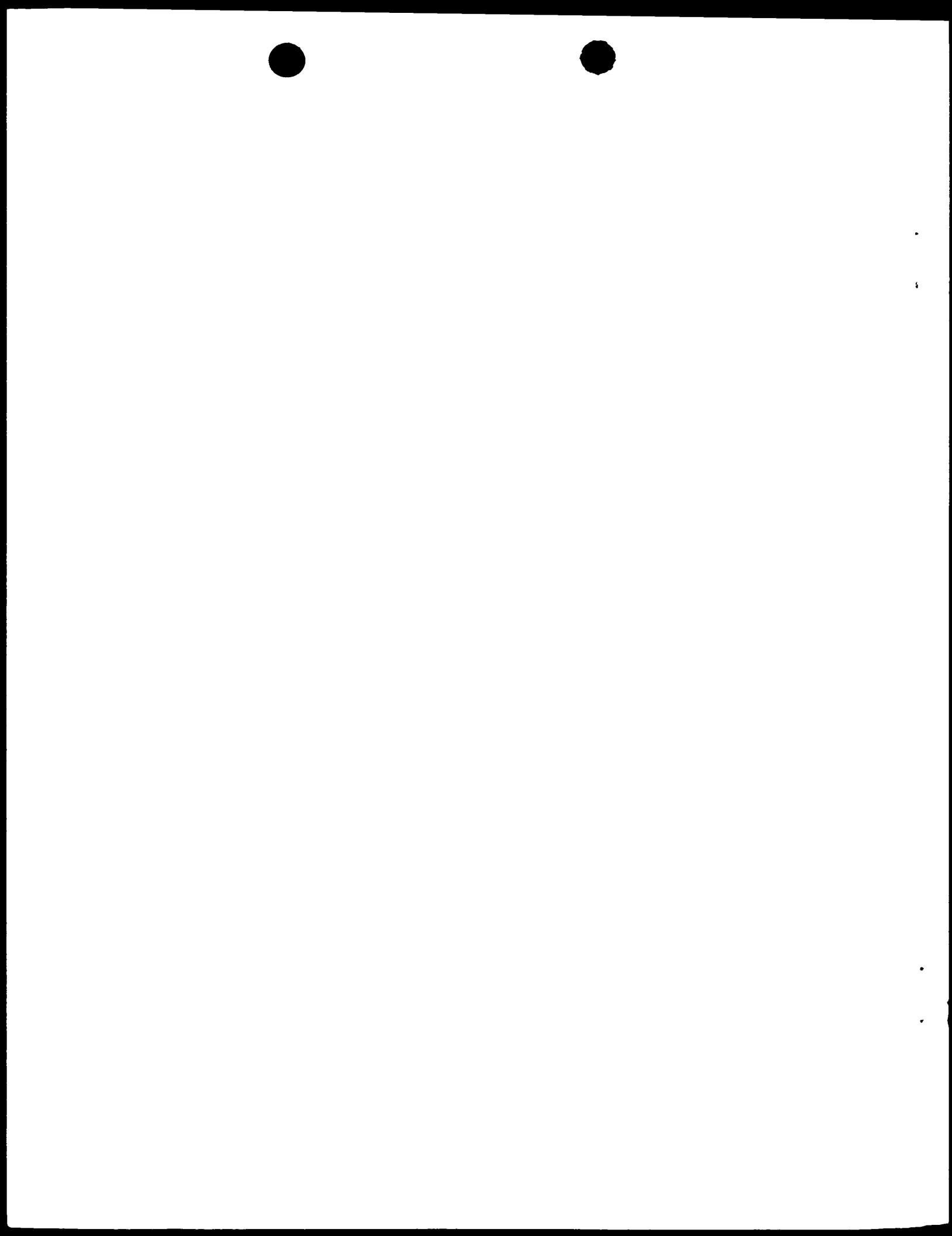
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

tgttgaattt agatctaactt acttaccttag gacagtgacc ttggccc 48



<210> 23

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

gtcttaagttt ccaccatggg gtttggctg agctgggttt tcctcgttgc tcttttaaga 60
ggtgccagt gtcagggtgca gctgggtggag tctggggag gcgtggtcca gcctgggagg 120
tccccgag 128

<210> 24

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

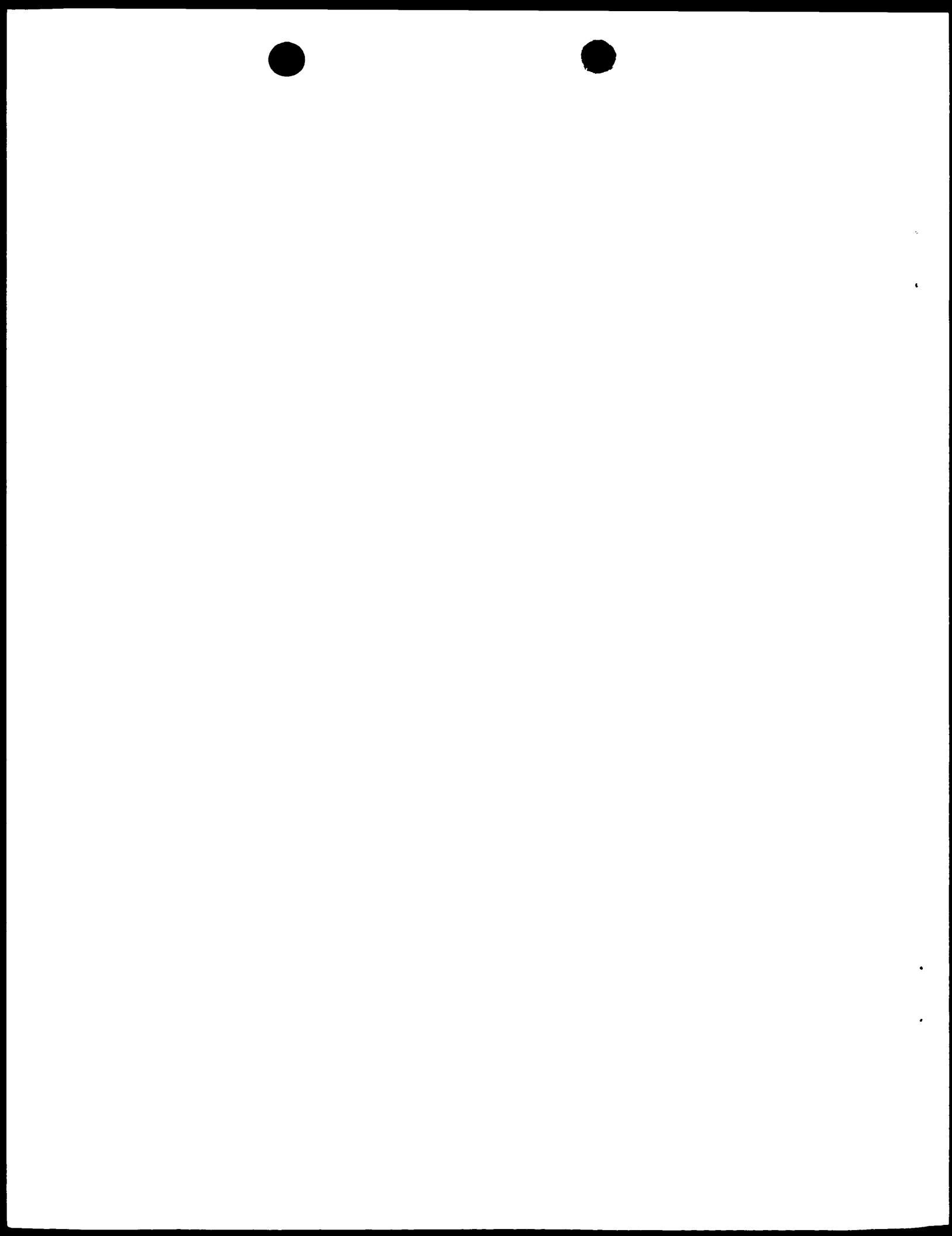
<400> 24

accatttagta gtgggtggtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg gcgattcacc 60
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 120
gacac 125

<210> 25

<211> 132

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

ctaccaccac tactaatggt tgccacccac tccagccct tgcctggagc ctggcgacc 60
caagacatgc catagtact gaaggtaat ccagaggctg cacaggagag tctcagggac 120
ctcccaggct gg 132

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

tgttgatcc ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc cccagtaagc aaagtaagtc 60
atagtagtct gtctcgaca gtaatacaca gccgtgtcct cagctctcag 110

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 27

gtcttaagctt ccaccatggg gtttgggctg 30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg 30

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

acaaaggctc caccatggcc tggacttc tc ttttttttt ctttggcttt cattgctcag 60
gttcttttctc ccagcttgc ctgacataat cgcctctgc ctctgcctcc ctgggagcct 120
cggtcaagct cac 133

<210> 30



<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

agcaagatgg aagccacagc acagggtgatg ggatccctga tgcgttctca ggcgccagct 60
ctggggctga gcgcgtacctc accatctcca gcctccagtc tgaggatgag gctgacta 118

<210> 31

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

ctgtggcttc catcttgctt aagtttcatc aagtaccgag ggcccttctc tggctgctgc 60
tgtatgccatt caatgggtta cgtactgtgc tgactactca aggtgcagggt gagcttgacc 120
gaggctcc 128

<210> 32

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag ttggccct ccgcgaaca ccctcacaaa 60
ttgtcccta attgtatcac ccacaccaca gtaatagtca gcctcatcct caga 114

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

acaaagcttc caccatg 17

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

cttggatccg ggctgacct 19



<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

cttggatccg ggctgaccta ggacggtcag tttggccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60
ttgttcctta attgt 75

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

aaaggatcct taagatccat caagtaccga gggggcttct ctg 43

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Synthetic DNA

<400> 37

acaaagctta gcgttacctc accatctcca gcctccagcc tgagga

46

<210> 38

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

tttggatccg ggctgaccta ggacggtcag tttggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60
tgttcccta attgtatcac ccacaccaca gatatagtca gcctcatcct c 111

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39

tttctctggc tgctgctgat accattcaat ggtgtacgta ct

42

<210> 40



<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

cgagggccct tctctggctg ctgcgt

26

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 41

gagaagggcc ctargtacst gatgrawctt aagca

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA



<400> 42

cacgaattca ctatcgatcc tggaaaccttc agagg

35

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 43

ggcttggagc tcctcaga

18

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 44

gacagttggtt caaagtttt

20

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus



<400> 45

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80
Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30



Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45
Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80



Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly
115

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met
35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro



115

<210> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 50

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30



Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 52

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met
35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80



Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115



<210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr

20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met

35 40 45

Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu

100 105 110

Thr Val Leu Gly Gln Pro

115

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 55

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20 25 30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
35 40 45
Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110
Thr Val Leu Gly Gln Pro
115

<210> 56

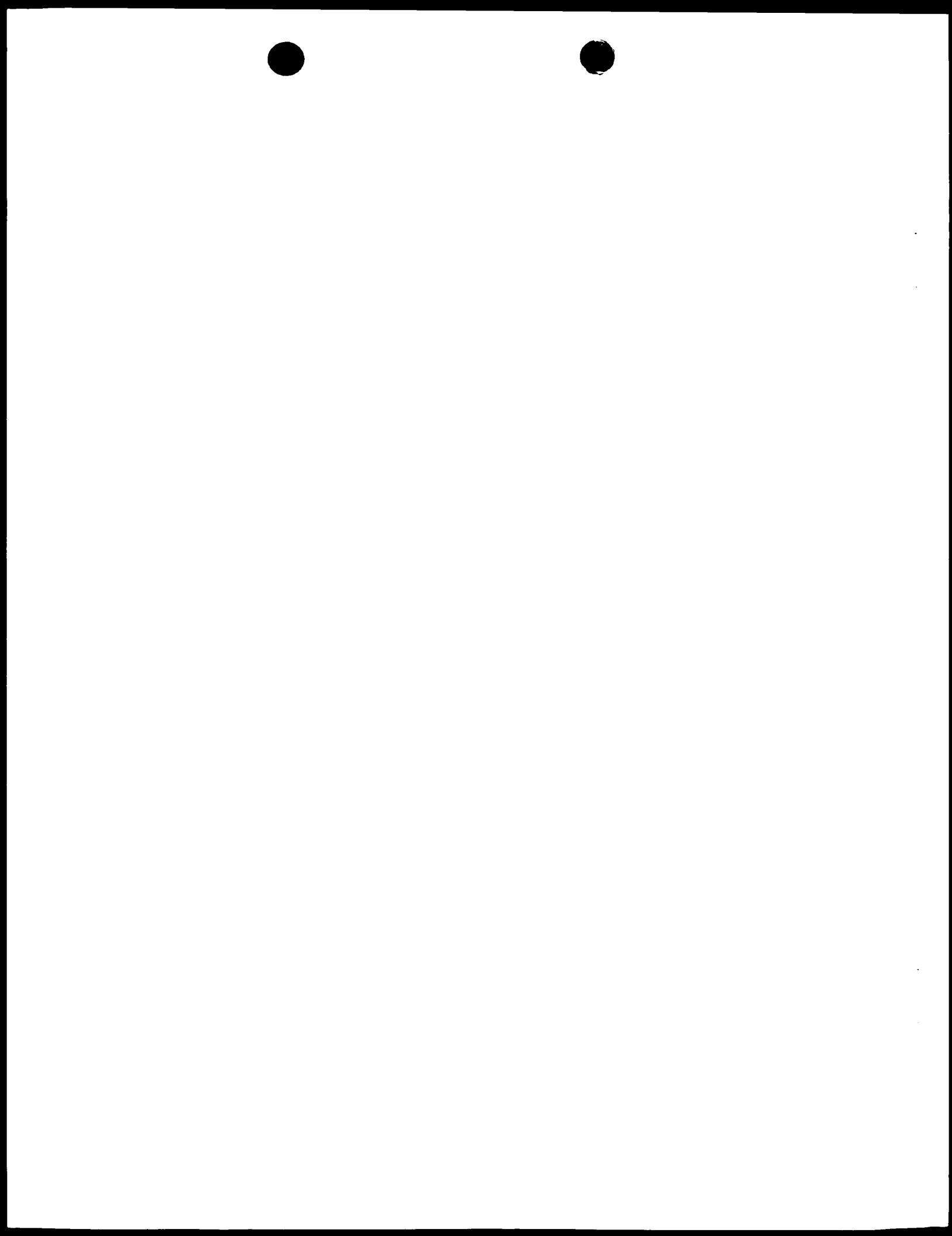
<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val



35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57

<211> 411

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 57

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

-15

-10

-5



gtc cag tgt gag gtg caa c ^t g g ^t g gag tct ggg gga gac tta gtg aag	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys	
-1 1 5 10	
cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc	144
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
15 20 25	
agt agc tat ggc atg tct tgg att cgc cag act cca gac aag agg ctg	192
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu	
30 35 40 45	
gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt agt tac acc tac tat cca	240
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro	
50 55 60	
gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac	288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn	
65 70 75	
acc cta tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg	336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met	
80 85 90	
ttt tac tgt gca aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc	384
Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly	
95 100 105	
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca	411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
110 115	

<210> 58

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens



<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 58

atg ggg ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48

Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

-15

-10

-5

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln

-1 1

5

10

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15

20

25

agt agc tat ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192

Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu

30

35

40

45

gag tgg gtg gca acc att agt agt ggt agt tac acc tac tat cca 240

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro

50

55

60

gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

65

70

75

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg 336



Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

80 85 90

tat tac tgt gcg aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly

95 100 105

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

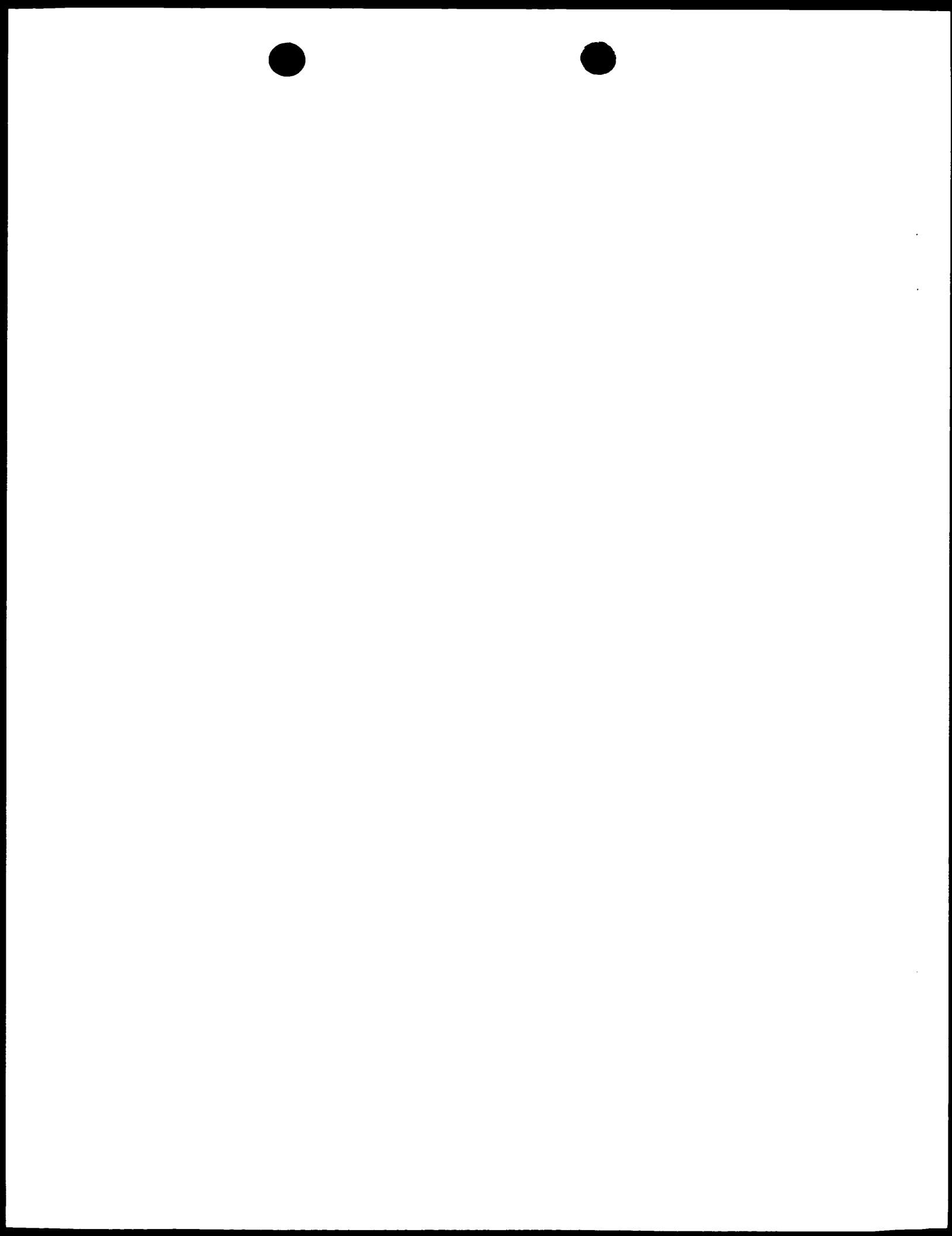
<400> 60

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 61

<211> 9



<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens



<400> 64

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 65

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tct ttc tcc caa ctt gtg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser

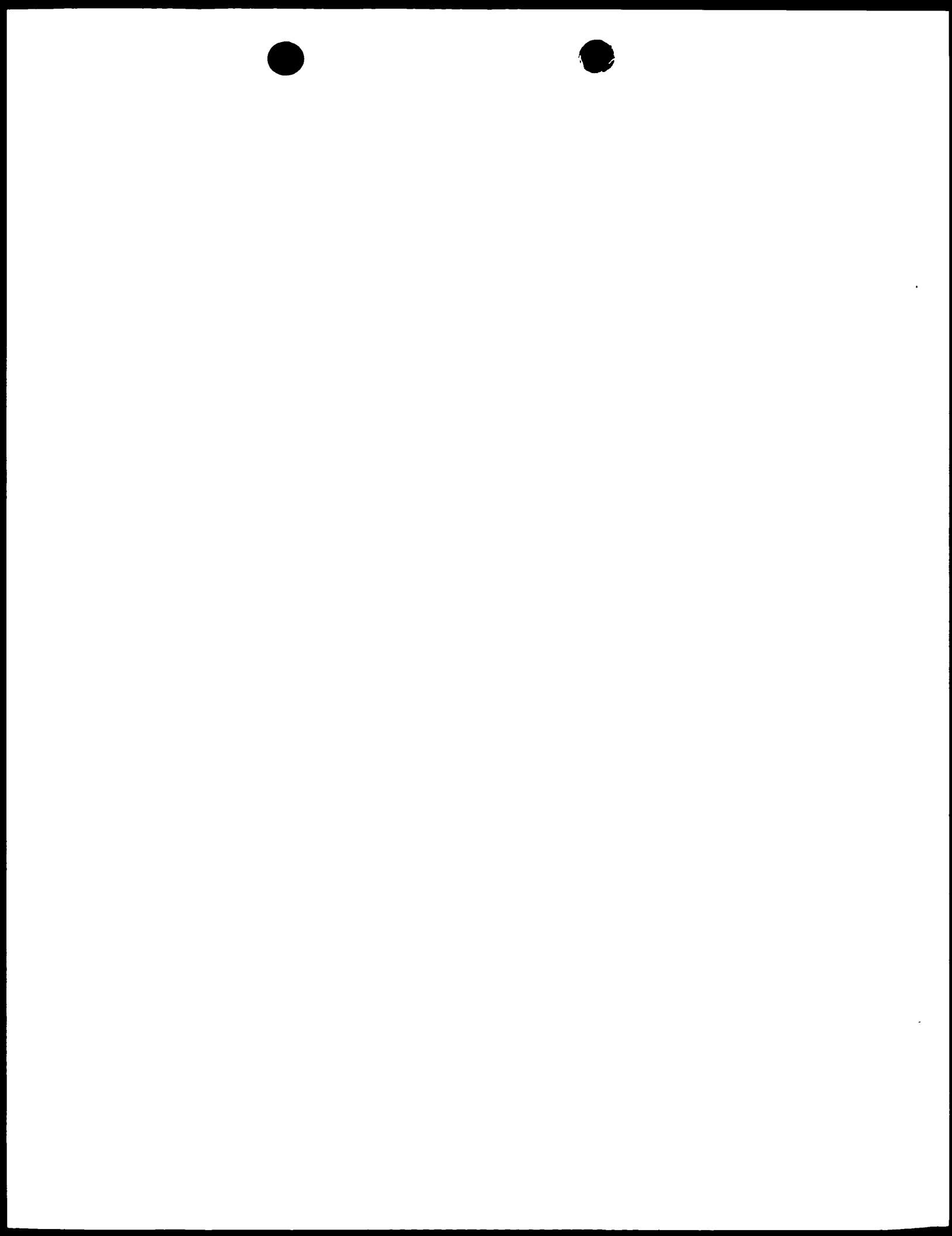
-1 1 5 10

ctg gga gcc tca gca aaa ctc acg tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tat cag caa cag cca ctc aag cct cct aag 192



Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys
 30 35 40 45
 tat gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggg gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tct gga tcc agc tct ggt gct gat cgc tac ctt 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu
 65 70 75
 agc att tcc aac atc cag cca gaa gat gaa gca atg tac atc tgt ggt 336
 Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tat gtt ttc ggc ggt ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aag gtc act gtc cta ggt cag ccc 411
 Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 66

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

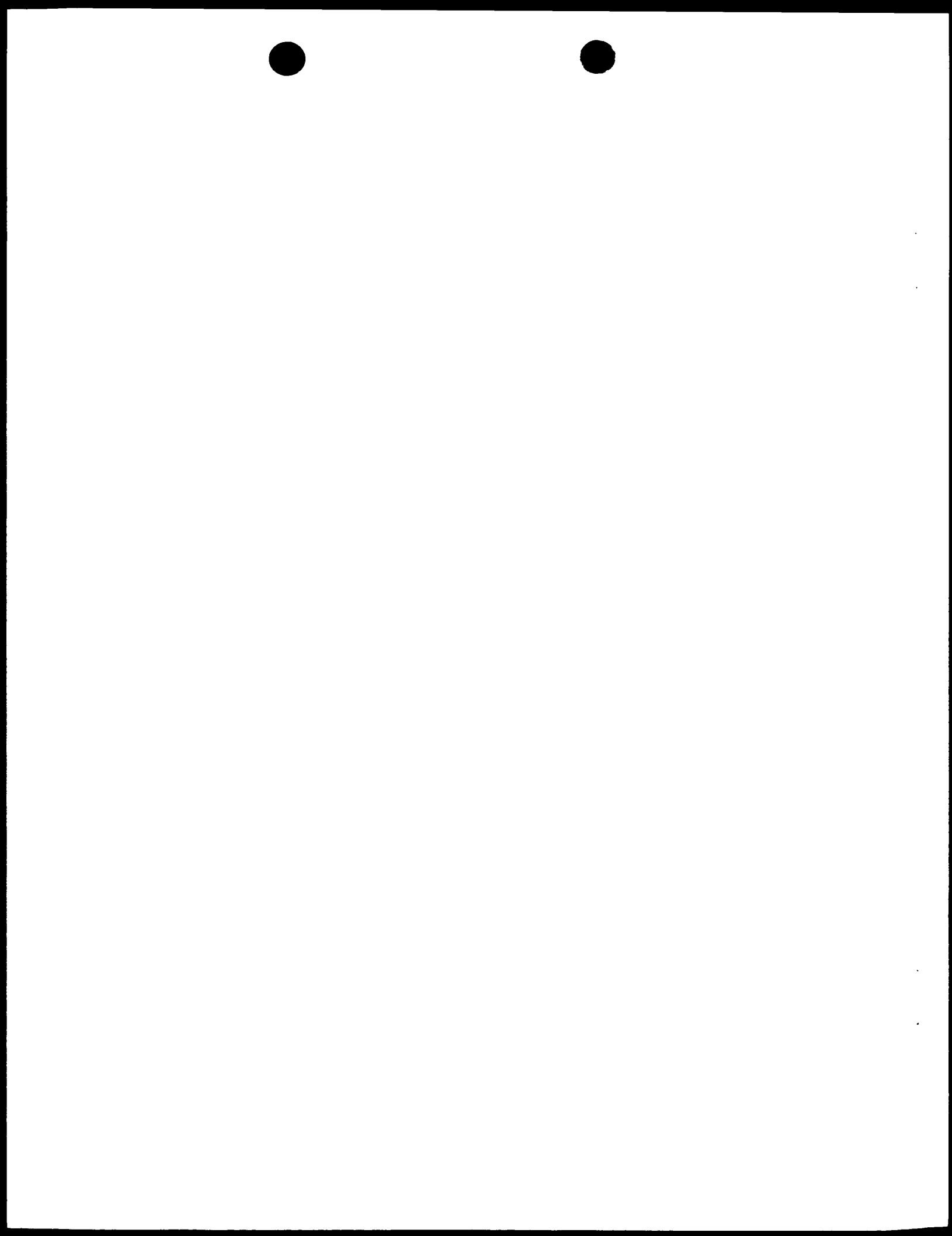
<221> mat_peptide



<222> (58) .. (411)

<400> 66

atg	gcc	tgg	aci	cct	ctc	ttc	tcc	ttt	gtt	ctt	cat	tgc	tca	ggt	48	
Met			Ala	Trp	Thr	Pro	Leu	Phe	Phe	Phe	Val	Leu	His	Cys	Ser	Gly
-15									-10						-5	
tct	ttc	tcc	cag	ctt	gtg	ctg	act	caa	tgc	ccc	tct	gcc	tct	gcc	96	
Ser																
5															10	
ctg	gga	gcc	tcg	gtc	aag	ctc	acc	tgc	acc	ttg	agt	agt	cag	cac	agt	144
Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	
15									20						25	
acg	tac	acc	att	gaa	tgg	cat	cag	cag	cca	gag	aag	ggc	cct	cgg	192	
Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	His	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg	
30									35						45	
tac	ttg	atg	aaa	ctt	aag	caa	gat	gga	agc	cac	agc	aca	ggt	gat	ggg	240
Tyr	Leu	Met	Lys	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	
50									55						60	
att	cct	gat	cgc	ttc	tca	ggc	tcc	agc	tct	ggg	gct	gag	cgc	tac	ctc	288
Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg	Tyr	Leu		
65									70						75	
acc	atc	tcc	agc	ctc	cag	tct	gag	gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	ggt	336
Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gly	
80									85						90	
gtg	ggt	gat	aca	att	aag	caa	ttt	gtg	tac	gtg	ttc	ggc	gga	ggg	384	
Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly		
95									100						105	
acc	aaa	ctg	acc	gtc	cta	ggt	cag	ccc							411	
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro								



110

115

<210> 67

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 67

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15

-10

-5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

-1 1

5

10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15

20

25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cca gag aag ggc cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys

30

35

40

45

tat ctg alg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240



Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
50 55 60
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
65 70 75
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
80 85 90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly
95 100 105
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

<210> 68

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 68



atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
 -15 -10 -5

 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10

 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25

 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
 30 35 40 45

 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60

 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75

 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90

 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105

 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115



<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 69

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

-1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg

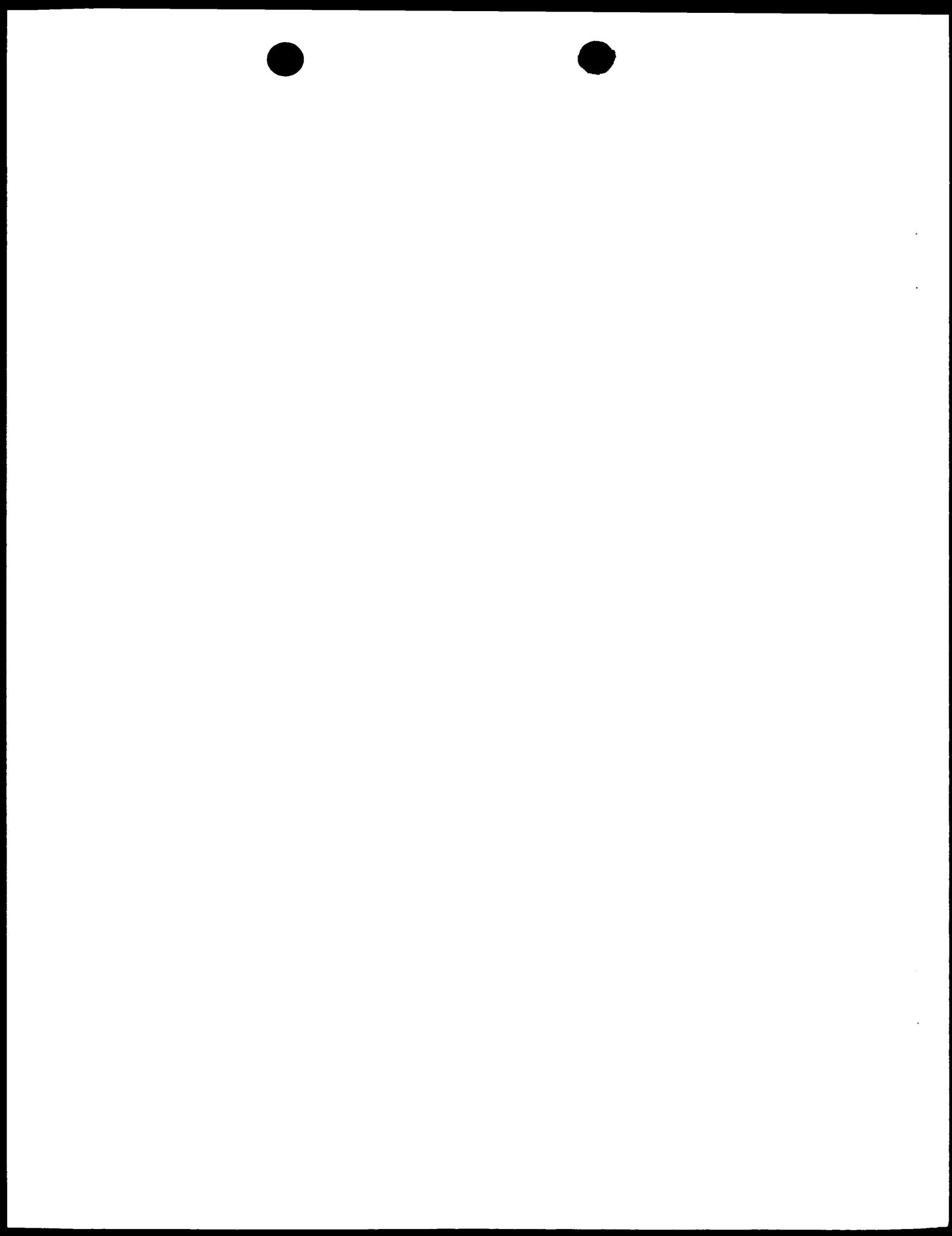
30 35 40 45

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240

Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50 55 60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288



Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
65 70 75
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
80 85 90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

<210> 70

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 70

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15

-10

-5



tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tct ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10

ctg gga gcc tct gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45

tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75

acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttgt tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105

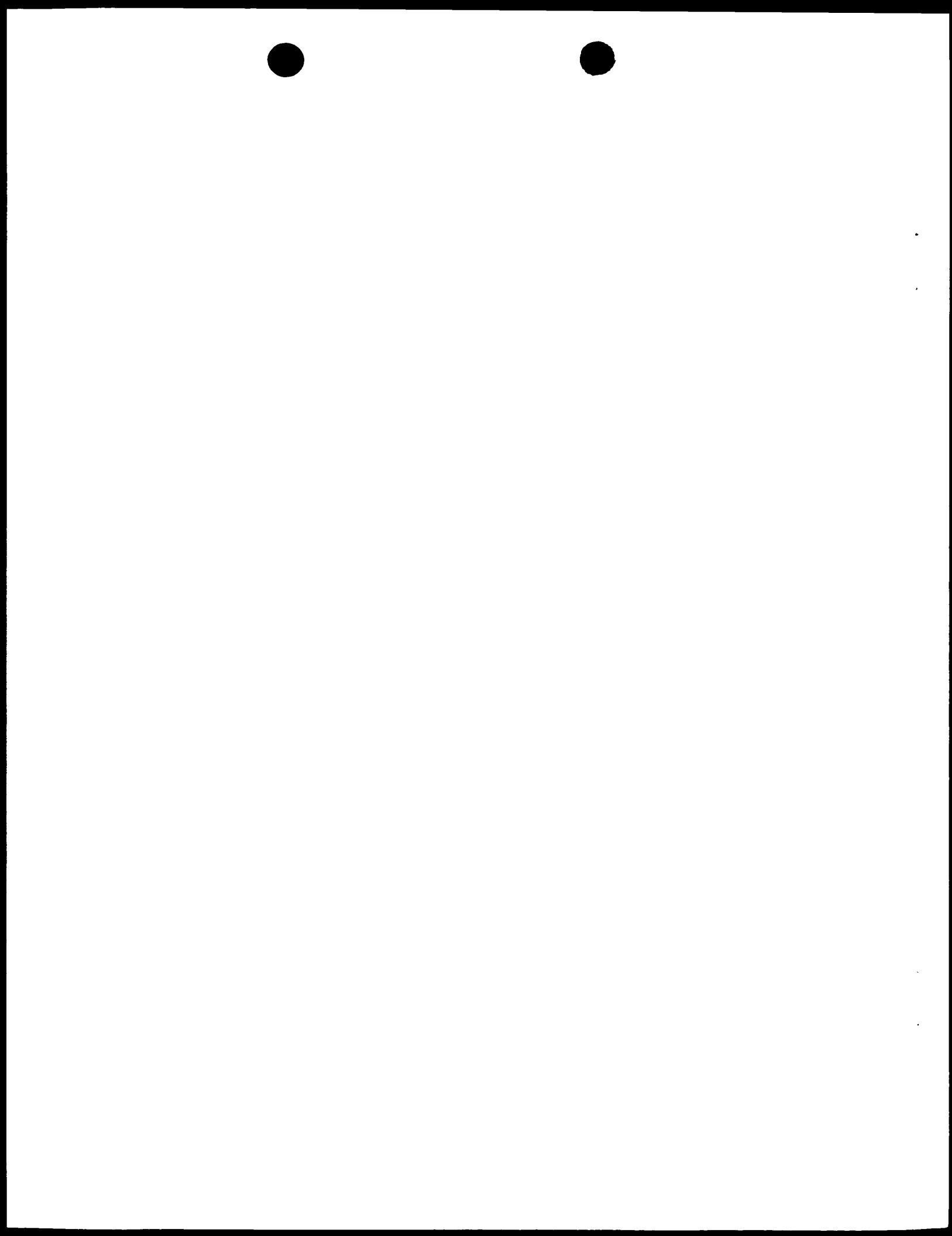
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 71

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens



('220')

221 CDS

222 · (1) · (411)

220

<221> mat peptide

<222> (58) . . (411)

〈400〉 71

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
 -15 -10 -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly

50	55	60
att ect gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc		288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu		
65	70	75



Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
80 85 90
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
95 100 105
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

<210> 72
<211> 411
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(411)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (58)..(411)

<400> 72
atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
-15 -10 -5
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgg ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
-1 1 5 10



ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 73

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS



<222> (1) . (411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58) . (411)

<400> 73

atg	gcc	tgg	act	cct	ctc	ttc	ttc	ttt	gtt	ctt	cat	tgc	tca	ggt	48	
Met	Ala	Trp	Thr	Pro	Leu	Phe	Phe	Phe	Val	Leu	His	Cys	Ser	Gly		
															-15	
															-10	
															-5	
tct	ttc	tcc	cag	ctt	gtg	ctg	act	caa	tgc	ccc	tct	gcc	tct	gcc	96	
Ser	Phe	Ser	Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala		
															-1	
															5	
															10	
ctg	gga	gcc	tcg	gtc	aag	ctc	acc	tgc	acc	ttg	agt	agt	cag	cac	agt	144
Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Gln	His	Ser	
															15	
															20	
															25	
acg	tac	acc	att	gaa	tgg	tat	cag	cag	cag	cca	gag	aag	ggc	cct	aag	192
Thr	Tyr	Thr	Ile	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Lys	
															30	
															35	
															40	
															45	
tac	gtg	atg	gat	ctt	aag	caa	gat	gga	agc	cac	agc	aca	ggt	gat	ggg	240
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	
															50	
															55	
															60	
att	cct	gat	cgc	ttc	tca	ggc	tcc	agc	tct	ggg	gct	gag	cgc	tac	ctc	288
Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg	Tyr	Leu		
															65	
															70	
															75	
acc	atc	tcc	agc	ctc	cag	tct	gag	gat	gag	gtt	gac	tat	atc	tgt	ggt	336
Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Ile	Cys	Gly	
															80	
															85	
															90	
gtg	ggt	gat	aca	att	aag	caa	ttt	gtg	tac	gtg	ttc	ggc	gga	ggg	384	



Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly

95 100 105

acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411

Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110 115

<210> 74

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 74

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser

-1 1 5 10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15 20 25



acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cca gag aag ggc cct agg			192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg			
30	35	40	45
tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg			240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly			
50	55	60	
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc			288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu			
65	70	75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt			336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly			
80	85	90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg			384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly			
95	100	105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc			411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro			
110	115		

<210> 75

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln			
1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His			
20	25	30	



Thr Ala



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P3/14, 29/00, 37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ A61K38/00-38/32, 45/00-45/08, 39/395,
 A61P3/14, 29/00, 37/00-37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN),
 BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 92/00753, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23 January, 1992 (23.01.92), Claims; page 1, lines 10 to 22 & JP, 5-509098, A	1-5, 9-11, 13, 15, 16
Y	Claims; page 5, lower right column to page 6, upper left column & AU, 9182900, A & EP, 539491, A1	6-8, 12, 14
X	US, 5849695, A (The Regents of the University of California), 15 December, 1998 (15.12.98), Claims; abstract (Family: none)	1-5, 9-11, 13
Y	Claims; implementation example & JP, 11-92500, A & EP, 962467, A1 & ZA, 9708590, A & AU, 9743972, A & NO, 9901449, A & CN, 1237983, A	6-8, 12, 14
X	WO, 98/13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 1998 (02.04.98), Claims; implementation example & JP, 11-92500, A & EP, 962467, A1 & ZA, 9708590, A & AU, 9743972, A & NO, 9901449, A & CN, 1237983, A	1-5, 9-11, 13, 15-17
X	JP, 11-80025, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 March, 1999 (23.03.99), Claims;	7, 8, 12, 14
		1-5, 9-11, 13, 15-17

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
06 September, 2000 (06.09.00)Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04414

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	& WO, 98/51329, & EP, 1004313, A1 & AU, 9872369, A & NO, 9905558, A	7,8,12
X	WO, 96/03437, A1 (SANDOZ LTD.), 08 February, 1996 (08.02.96),	1-5,9-11,13
Y	Claims; page 15, line 15 to page 17, line 26 & JP, 10-502091, A	6-8,12,14
	Claims; page 21, line 18 to page 23, line 8 & AU, 9531670, A & EP, 7739958, A1 & FI, 9700168, A & NO, 9700356, A & ZA, 9506331, A & BR, 9508433, A & KR, 97704782, A & MX, 9700446, A1	
X	EP, 293158, A2 (MERCK & CO. INC.), 30 November, 1988 (30.11.88),	1-5,9-11,13
Y	Claims; page 3, line 25 to page 4, line 19 & JP, 63-313800, A	6-8,12,14
	Claims; page 5, upper left column, line 8 to page 6, upper left column, line 17 & DK, 8802853, A	
X	JP, 7-316195, A (NIPPON KAYAKU CO., LTD.), 05 December, 1995 (05.12.95),	1-3,9-11,13
Y	Claims (Family: none)	6-8,12,14
X	WO, 96/39184, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA),	1-3,9-11,13,
Y	12 December, 1996 (12.12.96), Claims & US, 5660826, A & AU, 9658844, A	15,16 7,8,12,14
X	JP, 2-207099, A (Toa Nenryo Kogyo K.K.), 16 August, 1990 (16.08.90),	1,3-5,9-11, 13
Y	Claims; page 1, lower right column to page 2, lower right column, line 7 (Family: none)	7,8,12,14
X	JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92),	1,3-5,9-11, 13,15,16
Y	Claims; Par. Nos. [0002], [0003], [0010] (Family: none)	6-8,12,14
X	JP, 7-165790, A (Tonen Corporation), 27 June, 1995 (27.06.95),	1-5,9-11,13
Y	Claims; Par. Nos. [0001], [0002], [0005], [0008], (Family: none)	7,8,12,14
X	WO, 92/17602, A1 (The General Hospital Corporation Office of Technology Affairs), 15 October, 1992 (15.10.92),	1,3-5,9-11,13,
Y	Claims; page 40, line 14 to page 49, line 6 & JP, 6-506598, A, Claims; page 13, upper left column to page 15, upper left column, & EP, 579758, A1 & US, 5886148, A	15,16 6-8,12,14
X	WO, 96/33735, A1 (Cell Genesys, Inc.), 31 October, 1996 (31.10.96),	1,2,15-17
Y	Claims, page 16, line 23 to page 17, line 27; implementation example 7 & JP, 11-505523, A, claims; page 24, line 10 to page 25, line 9; implementation example 7 & EP, 822830, A1, & AU, 9656322, A & KR, 99008096, A & US, 6075181, A	7,8,12,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04414

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 878201, A1 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha), 18 November, 1998 (18.11.98), Claims	1-3
Y	& JP, 8-301887, A, Claims & WO, 97/27870, A1 & AU, 9715581, A	7, 8, 12, 14
Y	HARDMAN, J. G., et al., (ed.), "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS-9 th ed", McGraw-Hill Companies (USA), pp.1528-1529	6
Y	Shigeto MORIMOTO et al., "PTH/PTHrP to Chusu Shinkeikei", CLINICAL CALCIUM, 5(12), pp.50-54 (1995), see the full text	7, 8, 12
Y	YAMAMOTO, S. et al., "Parathyroid Hormone-Related Peptide-(1-34) [PTHrP-(1-34)] Induces Vasopressin Release from the Rat Supraoptic Nucleus in Vitro through a Novel Receptor Distinct from a Type I or Type II PTH/PTHrP Receptor", Endocrinology, 138(5), pp.2066-2072 (1997)	14
PX	WO, 00/00219, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 January, 2000 (06.01.00),	1, 3-5, 9-11, 13, 15-17
PY	Claims; page 2, the last line to page 3, the last line, & AU, 9942899, A	7, 8, 12, 14
PX	JP, 2000-80100, A (Japan Tobacco Inc.), 21 March, 2000 (21.03.00),	1-5, 9-11, 13-16
PY	Claims; Par. Nos. [0013], [0014], [0055], [0056]; implementation example (Family: none)	6-8, 12, 14
PX	WO, 99/57139, A2 (SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES S.A.), 11 November, 1999 (11.11.99), Claims; Abstract & AU, 9936736, A	1-3, 7, 8, 12
PX	JP, 11-222440, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 17 August, 1999 (17.08.99),	1-3
PY	Claims (Family: none)	14
A	Ryouji IKEDA, "Fuku Koujousen Hormone Kanren Peptide no Bunshi Seibutsugaku", Nihon Rinshou, 53(4), 1995, pp.37-45, Hajimeni, IV. Akusei Shuyou to PTHRP	1-17
A	ROSEN, H.N. et al., "The Effect of PTH Antagonist BIM-44002 on Serum Calcium and PTH Levels in Hypercalcemic Hyperparathyroid Patients", Calcif. Tissue Int., 61, pp.455-459 (1997)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04414

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

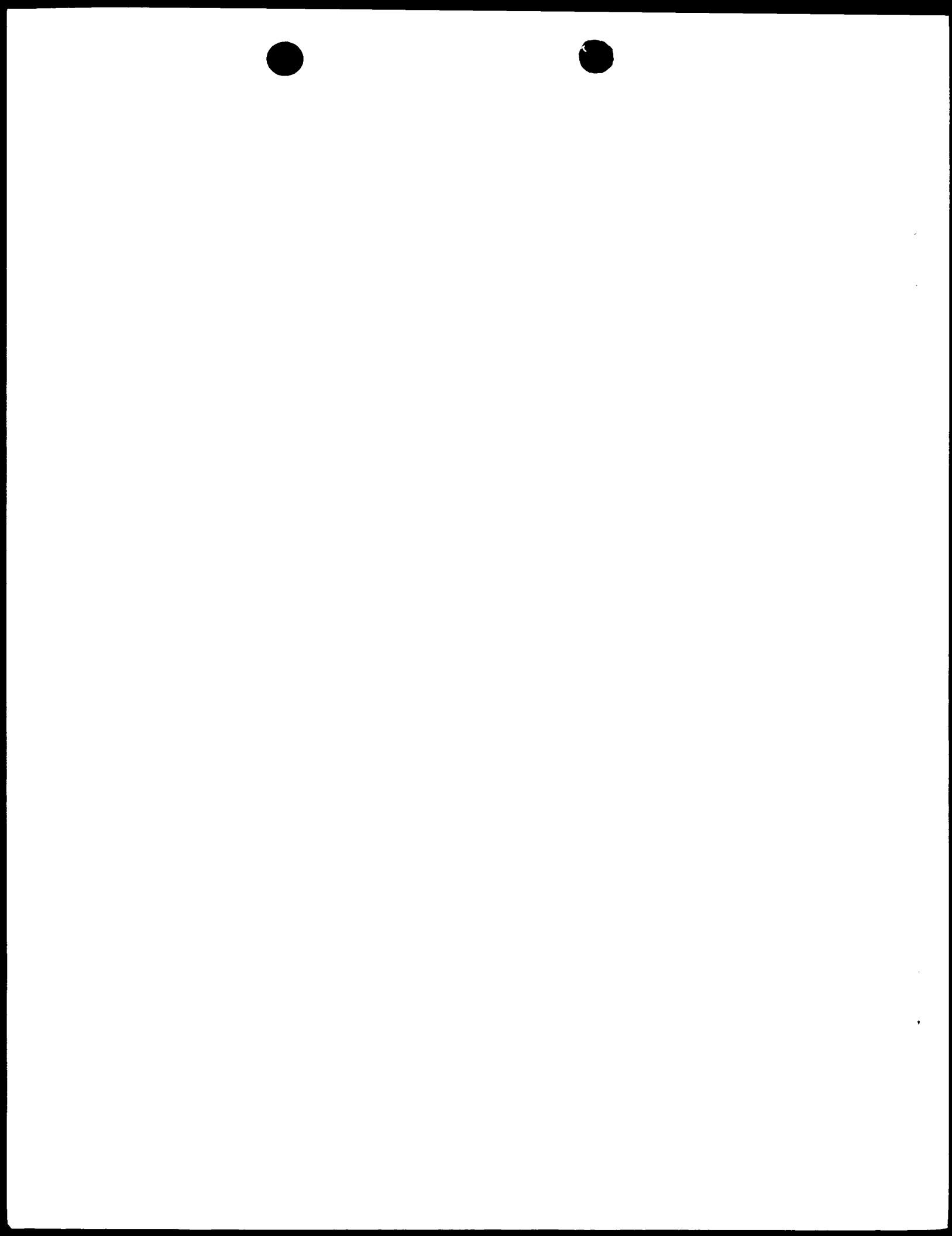
PCT/JP00/04414

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

Invention as set forth in claim 1 pertains to remedies for diseases caused by PTH or PTHrP which contain, as the active ingredient, an agonist or an antagonist binding to PTH receptor or PTHrP receptor or a substance binding to a ligand of such a receptor to thereby promote or inhibit the binding of the ligand to the receptor. As described in the documents (JP, 6-506598 A, JP, 4-228089, A, JP, 5-509098, A, etc.) cited in the description by the applicant, remedies for these diseases with the use of such ingredients had been widely known. Therefore, it is understood that the "special technical feature" in the present invention resides in particular diseases caused by PTH or PTHrP.

It is recognized that claims 1 to 17 in the present application pertain to groups of inventions 1) to 5) as shown below. However, it is not considered that there is a "special technical feature" among these groups of inventions. Such being the case, these groups of inventions are considered as not complying with the requirement of unity of invention:

- 1) claims 1, 2 and 6 and the parts in claims 14 to 17 depending on claims 1, 2 and 6;
- 2) claim 3 and the parts in claims 14 to 17 depending on claim 3;
- 3) claims 4 and 5 and the parts in claims 14 to 17 depending on claims 4 and 5;
- 4) claims 7, 8 and 12 and the parts in claims 14 to 17 depending on claims 7, 8 and 12; and
- 5) claims 9 to 11 and 13 and the parts in claims 14 to 17 depending on claims 9 to 11 and 13.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl: A 61 K 45/00, 39/395, A 61 P 3/14, 29/00, 37/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl: A 61 K 38/00-38/32, 45/00-45/08, 39/395,
A 61 P 3/14, 29/00, 37/00-37/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 92/00753, A 1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23. 1月. 1992 (23. 01. 92), 特許請求の範囲, 第1頁第10-22行,	1-5, 9-11, 13, 15, 16
Y	& JP, 5-509098, A, 特許請求の範囲, 第5頁右下欄-第6頁左上欄, & AU, 9182900, A, & EP, 539491, A1	6-8, 12, 14
X	U.S., 5849695, A (The Regents of the University of California), 15. 12. 1998 (15. 12. 98), 特許請求の範囲, 要約 (ファミリーなし)	1-5, 9-11, 13
Y		6-8, 12, 14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 06. 09. 00	国際調査報告の発送日 19.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 今村 玲英子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO, 98/13388, A1 (中外製薬株式会社), 2. 4月. 1998 (02. 04. 98), 特許請求の範囲, 実施例,	1-5, 9-11, 13, 15-17
Y	& JP, 11-92500, A, & EP, 962467, A1, & ZA, 9708590, A, & AU, 9743972, A, & NO, 9901449, A, & CN, 1237983, A	7, 8, 12, 14
X	J P, 11-80025, A (中外製薬株式会社), 23. 3月. 1999 (23. 03. 99), 特許請求の範囲, & WO, 98/51329, & EP, 1004313, A1, & AU, 9872369, A, & NO, 9905558, A	1-5, 9-11, 13, 15-17
Y		7, 8, 12
X	WO, 96/03437, A1 (SANDOZ LTD.), 8. 2月. 1996 (08. 02. 96), 特許請求の範囲, 第15頁15行—第17頁26行	1-5, 9-11, 13
Y	& JP, 10-502091, A, 特許請求の範囲, 第21頁18行—第23頁8行 & AU, 9531670, A, & EP, 7739958, A1, & FI, 9700168, A, & NO, 9700356, A, & ZA, 9506331, A, & BR, 9508433, A, & KR, 97704782, A, & MX, 9700446, A1	6-8, 12, 14
X	EP, 293158, A2 (MERCK & CO. INC.), 30. 11月. 1988 (30. 11. 88), 特許請求の範囲, 第3頁25行—第4頁19行,	1-5, 9-11, 13
Y	& JP, 63-313800, A, 特許請求の範囲, 第5頁左上欄8行—第6頁左 上欄17行, & DK, 8802853, A	6-8, 12, 14
X	J P, 7-316195, A (日本化薬株式会社), 5. 12月. 1995 (05. 12. 95), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3, 9-11, 13
Y		6-8, 12, 14
X	WO, 96/39184, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 12. 12月. 1996 (12. 12. 96), 特許請求の範囲, & US, 5660826, A, & AU, 9658844, A	1-3, 9-11, 13, 15, 16
Y		7, 8, 12, 14
X	J P, 2-207099, A (東亜燃料工業株式会社), 16. 8月. 1990 (16. 08. 90), 特許請求の範囲, 第1頁右下欄—第2頁右下欄第7行 (ファミリーなし)	1, 3-5, 9-11, 13
Y		7, 8, 12, 14
X	J P, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社), 18. 8月. 1992 (18. 08. 92), 特許請求の範囲, 【0002】，【0003】，【0010】 (ファミリーなし)	1, 3-5, 9-11, 13, 15, 16
Y		6-8, 12, 14

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	JP, 7-165790, A (東燃株式会社), 27. 6月. 1995 (27. 06. 95),	1-5, 9-11, 13
Y	特許請求の範囲, 【0001】 , 【0002】 , 【0005】 , 【0008】 (ファミリーなし)	7, 8, 12, 14
X	WO, 92/17602, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS) , 15. 10月. 1992 (15. 10. 92) ,	1, 3-5, 9-11, 13, 15, 16
Y	特許請求の範囲, 第40頁14行-第49頁6行, & JP, 6-506598, A, 特許請求の範囲, 第13頁左上欄-第15頁左上 欄, & EP, 579758, A1, & US, 5886148, A	6-8, 12, 14
X	WO, 96/33735, A1 (CELL GENESYS, INC.) , 31. 10月. 1996 (31. 10. 96) ,	1, 2, 15-17
Y	特許請求の範囲, 第16頁23行-第17頁27行, 実施例7, & JP, 11-505523, A, 特許請求の範囲, 第24頁10行-第25頁9行, 実 施例7, & EP, 822830, A1, & AU, 9656322, A, & KR, 99008096, A, & US, 6075181, A	7, 8, 12, 14
X	EP, 878201, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 18. 11月. 1998 (18. 11. 98) ,	1-3
Y	特許請求の範囲, & JP, 8-301887, A, 特許請求の範囲, & WO, 97/27870, A1, & AU, 9715581, A	7, 8, 12, 14
Y	HARDMAN, J. G., et al. (ed.), "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS - 9th ed", McGraw-Hill Companies (U. S. A.), pp. 1528-1529	6
Y	森本茂人ら, 「PTH/PTHrPと中枢神経系」, CLINICAL CALCIUM, 5(12), pp. 50-54 (1995), 全文参照	7, 8, 12
Y	YAMAMOTO, S., et al., "Parathyroid Hormone-Related Peptide- (1-34) [PTHrP-(1-34)] Induces Vasopressin Release from the Rat Supraoptic Nucleus <i>in Vitro</i> through a Novel Receptor Distinct from a Type I or Type II PTH/PTHrP Receptor", Endocrinology, 138(5), pp. 2066-2072 (1997)	14
P X	WO, 00/00219, A1 (中外製薬株式会社), 6. 1月. 2000 (06. 01. 00) ,	1, 3-5, 9-11, 13, 15-17
P Y	特許請求の範囲, 第2頁最下行-第3頁最下行, & AU, 9942899, A	7, 8, 12, 14
P X	JP, 2000-80100, A (日本たばこ産業株式会社), 21. 3月. 2000 (21. 03. 00) ,	1-5, 9-11, 13-16
P Y	特許請求の範囲, [0013], [0014], [0055], [0056], 実施例 (ファミリーなし)	6-8, 12, 14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/04414

C(続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 99/57139, A2 (SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES S.A.) , 11. 11月. 1999 (11. 11. 99), 特許請求の範囲, 要約, & AU, 9936736, A	1-3, 7, 8, 12
P X	J P, 11-222440, A (旭化成工業株式会社) , 17. 8月. 1999 (17. 08. 99), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3
P Y		14
A	池田恭治, 「副甲状腺ホルモン関連ペプチドの分子生物学」, 日本臨牀, 53(4), 1995, pp. 37-45, はじめに, IV. 悪性腫瘍とPTHRP	1-17
A	ROSEN, H.N., et al., "The Effect of PTH Antagonist BIM-44002 on Serum Calcium and PTH Levels in Hypercalcemic Hyperparathyroid Patients", Calcif. Tissue Int., 61, pp. 455-459 (1997)	1-17

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの3の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかつた。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（別紙参照のこと）

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

○第Ⅱ欄の続き

請求の範囲1に係る発明は、PTH受容体又はPTHRP受容体に結合するアゴニスト又はアンタゴニスト作用物質、または、これらの受容体のリガンドに結合してリガンドと受容体の結合を促進又は阻害する物質を有効成分として含む、PTHまたはPTHRPに起因する疾患の治療剤に関するものであるが、出願人が明細書に引用している文献（JP, 6-506598, A、JP, 4-228089, A、JP, 5-509098, Aなど）にもあるように、かかる成分を利用した、かかる疾患の治療剤は広く知られているものであるから、本願発明における「特別な技術的特徴」はPTHまたはPTHRPに起因する具体的な疾患にあるものと認められる。

そして本願の請求の範囲1－17は以下の1)～5)に示す発明を有するものと認められるが、これらの発明の間に「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係があるものとは認められず、本願は発明の單一性の要件を満たしていない。

- 1)請求の範囲1, 2及び6並びに請求の範囲14－17のうち、請求の範囲1, 2及び6を引用する部分
- 2)請求の範囲3及び請求の範囲14－17のうち、請求の範囲3を引用する部分
- 3)請求の範囲4及び5並びに請求の範囲14－17のうち、請求の範囲4及び5を引用する部分
- 4)請求の範囲7, 8及び12並びに請求の範囲14－17のうち、請求の範囲7, 8及び12を引用する部分
- 5)請求の範囲9－11及び13並びに請求の範囲14－17のうち、請求の範囲9－11及び13を引用する部分